Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik von Hormon- und Stoffwechselstörungen
Direktor: Professor Dr. D. Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

EINE MODIFIZIERTE METHODE ZUR BESTIMMUNG DES ERYTHROPOIETIN-GEHALTES IM URIN VON NORMALKINDERN AN POLYGLOBULEN MÄUSEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hans-Joachim Masur
aus Münsingen

1977

Dekan: Prof. Dr. R. Lempp

Berichterstatter: Prof. Dr. D. Gupta

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen Eltern und meiner Frau

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Historische Entwicklung der Erythropoietin-Forschung	1
II.	Einführung in die Fragestellung	3
III.	Eigenschaften von Erythropoietin	
	1. Chemie	4
	2. Bildungsorte	6
	3. Biogenese	6
	4. Regulation der Erythropoietin-Sekretion	8
	5. Wirkung von Erythropoietin	9
IV.	Klinische Bedeutung von Erythropoietin	10
V.	Einheits-Bezeichnungen und Standards	12
VI.	Methoden der Erythropoietin-Qualifizierung und -Quantifizierung	
	1. Bioassays:	
	1.1 in vivo-Assays	15
	1.2 in vitro-Assays	18
	2. Immunochemische Methoden:	
	2.1 Hämagglutination-Inhibition-Assay	19
	2.2 Radioimmunassay	21
VII.	Reindarstellung von Erythropoietin	23
VIII.	Harneinengungs-Verfahren zur Gewinnung von Erythropoietin	
	1. Perevaporation	25
	2. Gefriertrocknung	26
	3. Dialyse	27
	4. Präzipitation mit Äthanol	28
	5. Präzipitation mit Benzoesäure	28
	6. Ultrafiltration	28
IX.	Eigenes methodisches Vorgehen	30
X.	Patientengut	38
XI.	Ergebnisse:	
	1. Standard-Kurve	40
	2. Normalwerte	46

Seite

XII.	Diskussion	49
XIII.	Zusammenfassung	56
XIV.	Tabellen-Anhang	57
XV.	Literaturverzeichnis	62

I. HISTORISCHE ENTWICKLUNG DER ERYTHROPOIETIN-FORSCHUNG

1) Die Franzosen CARNOT und DEFLANDRE entdeckten nach subkutanen Injektionen von Kaninchen-Serum, die einem Aderlaß unterzogen wurden, bei anderen Kaninchen einen deutlichen Erythropoietin-Anstieg und nannten den vermuteten Humoralfaktor im Serum der Spenderkaninchen "hemopoiétine" (10).

2) Die zweite Phase der Erythropoietin-Forschung leitete 1938 der Koreaner YU TIN TEI ein (115b), der im Blutserum von Kaninchen mit stimulierter Erythropoiese zwei Faktoren mit erythropoietischer Wirkung fand:

   1. Faktor: Eiweißnatur, alkohol-unlöslich, Absorption an Kaolin, Zerfall bei über 60° C.

   2. Faktor: Lipoidnatur, löslich in Alkohol, Äther, Aceton; thermostabil bei Erhitzen auf 100° C.

3) HOFF und BEER konnten 1938 an Parabiose-Versuchen die nervös bedingte Freisetzung humoraler Wirkstoffe zeigen, die das leukocytäre bzw. erythrocytäre System stimulieren (65).

4) ERSLEV hatte den Mut, große Mengen Hasenserum Empfängertieren zu injizieren und erzielte damit einen erythropoietischen Effekt (22).

5) BORSOOK konnte in der Erkennung der Erythropoietin-Eigenschaften einen bedeutenden Schritt nach vorne machen, als er zeigte, daß die "erythropoietisch stimulierende Substanz"

in saurem gekochtem Plasma vorhanden ist (= acidified boiled plasma) (7).

6) HODGSON et al. wiesen als erste die erythropoietische Aktivität in Urin und Plasma von entbluteten Hasen nach (64).

7) REISSMANN bestätigte das Wirken eines humoralen erythropoietisch wirkenden Faktors, indem er bei einem Paar parabiotischen Ratten bei beiden Tieren eine erythropoietische Stimulation feststellte. Dabei atmete eine Ratte Luft mit niedrigem O_2-Druck ein, die andere Normalluft. Dies zeigte, daß der Faktor durch die Passage von einem Tier auf das andere übertragen wurde (213).

8) JOCOBSON et al. fanden eine direkte Abhängigkeit von Sauerstoff-Druck im Blut und Sauerstoff-Mangel im Gewebe. Diese Untersuchungen führten zu sensibleren Assay-Methoden (71).

9) GORDON et al. brachten die Erythropoietin-Forschung in Fragen der endokrinologischen Einflüsse auf die Erythropoiese, der Entstehungsorte, physiochemischer Eigenschaften und Biogene entscheidend voran und entwickelten sensible Assays (58).

10) ESPADA und GUTINSKY gelang es 1970, durch ein spezielles Verfahren aus dem Urin von Anämie-Patienten (durch Hakenwurmbefall) Erythropoietin mit einer Aktivität von 8000 units/mg Protein darzustellen (27).

11) GOLDWASSER et al. gewannen 1971 aus anämischem Schafplasma 9000 u/mg Protein Erythropoietin-Aktivität (50).

12) MYAKE et al. gelang nach Angaben von GOLDWASSER jüngst die Darstellung von Erythropoietin mit einer Mindestaktivität von 20 000 u/mg Protein aus dem Urin von Patienten mit aplastischer Anämie (47).

II. EINFÜHRUNG IN DIE FRAGESTELLUNG

REISSMANN (113) und STOHLMAN et al. (130) bewiesen in ihren Arbeiten die Existenz eines humoralen Faktors, der die Erythropoiese steuert. Es hat sich jedoch auch gezeigt, daß Erythropoietin bei verschiedenen Erkrankungen eine Rolle spielt und deshalb von klinischer Relevanz ist.

MIRAND et al. (104) berichteten, daß die Assay-Methoden häufig die Erythropoietin-Konzentrationen im Plasma normaler Menschen nicht erfassen können. Erst die Einführung von brauchbaren Methoden, das Erythropoietin aus dem 24-Std.-Urin zu konzentrieren (33, 1, 2), führten zur Erfassung meßbarer Erythropoietin-Konzentrationen im normalen Urin.

Es wurden verschiedene Erythropoietin-Gewinnungs-Methoden, Assay-Methoden in vivo und in vitro sowie Immuno-Assays entwickelt mit dem Ziel einer möglichst hohen Reinheit und Ausbeute von Erythropoietin zum einen und einer möglichst genauen Erfassung der Testpräparate zum andern.

Unsere Arbeit wendet eine modifizierte Bioassay-Methode sowie die Konzentrierung von 24-Std.-Urin mit einem Ultrafiltrations-Ver-

fahren an, um eine Standard-Kurve herzustellen und Normalwerte zu erfassen. Sie stellt dabei einzelne Methoden auch in den Teilbereichen der Versuche gegenüber.

III. EIGENSCHAFTEN VON ERYTHROPOIETIN

1. Chemie

Menschliches Erythropoietin ist ein saures alpha-1-Glycoprotein, ist nicht dialysierbar und relativ hitzestabil. Der Proteingehalt beträgt 68,3 %, wandert elektrophoretisch mit der alpha-1-Globulinfraktion und weist einen hohen Gehalt an Neuraminsäure (8,3 %), Hexose (8,2 %) und Hexosamin (10,2 %) auf (53, 16).

Mit Hilfe selektiver Membrandialyse gewannen LEWIS et al. aus Urinkonzentraten zwei biochemisch unterschiedliche Faktoren der Erythropoiese-Stimulation, wobei der Faktor des Diffusats keine Neuraminsäure und nur wenig Hexosamin und Protein enthielt (91).

Erythropoietin, aus Schafplasma gewonnen, besitzt ein MG von 46 000 (51). Die Angaben über das MG von Erythropoietin aus menschlichen Urin sind bei den einzelnen Autoren verschieden. GOLDWASSER und KUNG (51) geben den niedrigsten MG-Wert von 27 000 an, LUKOWSKY und PAINTER (97) den höchsten von 61 800, der beim Erythropoietin des Schafplasmas die selbe Höhe zeigt, und O'SULLIVAN (106) ein MG von 32 600. Für die differierenden Ergebnisse bei der Molekulargewichts-Bestimmung ist vermutlich die mögliche Bindung an ein Trägermolekül verantwortlich (49).

Der Molekülradius beträgt 33 A° (106). Das Molekül ist offenbar langgestreckt und weist ein axiales Verhältnis von 10:1 auf (117).

Bei in-vivo-Versuchen sind nur die salzsauren Endfraktionen von Erythropoietin aktiv, bei Versuchen mit Knochenmark-Kulturen wirkt auch nicht saures Erythropoietin (52). Neuraminsäure und basische Aminosäuren (Lysin und Arginin) von Erythropoietin scheinen für die biologische und chemische Stabilität, nicht aber für die biologische Aktivität nötig zu sein.

Neuramidase bewirkt bei Erythropoietin eine Inaktivierung in vivo, nicht jedoch in vitro. GOLDWASSER et al. vermuten, daß Neuraminsäure die Bindung an ein Transportmolekül bewirkt (49). Die biologische Aktivität liegt bei 8000 Einheiten pro mg Protein (60).

Erst bei extremen pH-Werten unter 5 und über 9 sowie bei bakteriellen Verunreinigung und enzymatischem Abbau kommt es im Urin zu einem Aktivitätsverlust (96), während es sonst im sauren Milieu stabil bleibt (99). Selbst 6 Jahre führen bei erythropoietin-haltigem Urin im gefrorenem Zustand zu keinem Aktivitätsverlust (77).

Das Erythropoietin des Schafplasmas erwies sich gegenüber dem des menschlichen Urins als stabiler (49). Im lyophilisierten Zustand zeigt das Standard-B-Präparat bei + 20° C nach 2 Jahren keinen und bei 37° C erst nach 17 oder 21 Monaten einen geringen Aktivitäts-Verlust (17).

2. Bildungsorte

Durch JACOBSON et al. wurde die Niere als der Hauptbildungsort von Erythropoietin bewiesen (44). BUSUTTIL et al. fanden mit immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen die epithelialen Zellen der Glomerulusschlingen als Hauptproduzenten von Erythropoietin heraus (9). Zu diesem Ergebnis führte auch der Nachweis von Erythropoietin-Bildung in epithelialen Monolayerkulturen aus isolierter Glomerula (8). Andere Autoren halten den juxtaglomulären Apparat und die Tubulusepithelien für den Erythropoietin-Bildungsort (43). Vermutlich in den Kupferschen Zellen der Leber ist extrarenal der wichtigste Erythropoietin-Bildungsort zu suchen (36).

3. Biogenese

KURATOWSKA et al. (84) entdeckten bei Perfusions-Versuchen mit isotoner Salzlösung an isolierten Nieren, daß erst nach Inkubation mit Serum in der Spülflüssigkeit eine Erythropoietinaktivität nachweisbar wurde und schlossen daraus auf einen ursächlichen Faktor. Diesen Faktor nennen GORDON et al. "Erythrogenin" (EG) bzw. den "renalen erythropoietischen Faktor"(REF) (60). Dieser ist ein Enzym der Niere und in der Fraktion der leichten Mitrochondrien enthalten. Er ist auch in Leber und Milz nachweisbar (74). Die REF-Serum-Reaktion zur Bildung von Erythropoietin verläuft als Kinetik erster Ordnung und ist innerhalb der Säugetierreihe ebenso wie die Erythropoietin-Wirkung nicht artspezifisch (60).

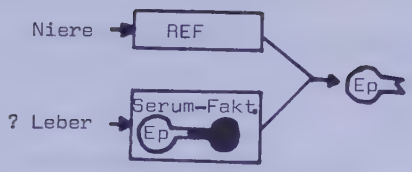

Abb. 1: Biogenese-Konzept von Erythropoietin nach GORDON (60)

Nach Ansicht von PESCHLE et al. (108) führt ein noch nicht bekannter Serum-Faktor zur Aktivierung eines Pro-Ep-Moleküls (= REF I) und damit zum biologisch aktiven Erythropoietin (= REF II). Dabei müssen im REF I die Antigen-Determinanten durch das Trägermolekül maskiert sein, um einem Erkennen des Pro-EP durch Anti-Ep-Serum vorzubeugen. REF I existiert nur in geringen Mengen in der Niere und hat bei Hypoxie eine hohe Turnover-Rate.

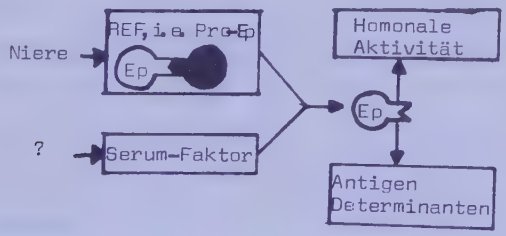

Abb. 2: Biogene-Konzept von Erythropoietin nach PESCHLE (108)

Die extrarenale Erythropoietin-Bildung wird durch Nephrektomie und/oder Hypoxie gesteigert und führt bei nephrektomierten,

hypoxemisch stimulierten Ratten im Vergleich zu nicht nephrektomierten Kontrolltieren zu einer 10 % höheren Erythropoietin-Aktivität (70).

4. Regulation der Erythropoietin-Sekretion

Eine zentralnervöse Regulation auf die Erythropoietin-Sekretion beweisen Versuche mit Elektrostimulation. Die im Hypothalamus implantierten Elektroden bei Ratten, Kaninchen oder Rhesusaffen lösen eine Retikulozytenkrise bzw. Erythrozytose aus (31, 104, 123). Dies geschah auch nach zusätzlicher Hypothysektomie (103) und unterstützt Aussagen älterer Beobachtungen, daß die Stimulation der Erythropoietin-Ausschüttung über das autonome Nervensystem abläuft (80).

Nach ADAMSON et al. ändert sich die Erythropoietin-Sekretion mit dem Tagesablauf (1) und ist geschlechtsabhängig (2, 133).

ERSLEV schließlich vertritt die Ansicht, daß die Niere der Hauptbildungsort für Erythropoietin ist. Die Bildung verläuft in 2 Phasen:

1. Programmier-Phase ab absinkendem Sauerstoff-Partialdruck
2. Synthetisierungs-Phase.

Die auf die Erythropoiese wirkenden Stimuli scheinen nur für die 1. Phase verantwortlich zu sein, während die 2. Phase in einer programmierten Proteinsynthese besteht (25).

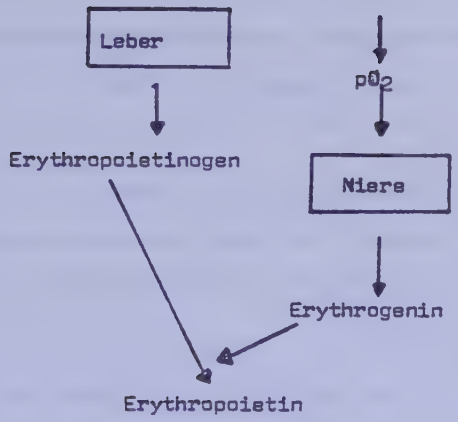

Abb. 3: Biogene von Erythropoietin nach ERSLEV (25)

5. Wirkung von Erythropoietin

Erythropoietin führt zum einen zu einer Stiegerung der erythropoietisch determinierten, aber nicht pluripotenten Stammzellen (= "Erythropoietin responsive cell" = ERC), was die durch wiederholte Erythropoietin-Injektionen an zytostatisch vorbehandelten markinsuffizienten Mäusen gesteigerte Fe^{59}-Inkorporation in die Erythrocyten zeigt (114). Dabei ist die Zahl der pluripotenten Stammzellen jedoch nicht erhöht (Milzkolonie-Technik).

Ein einmaliger Erythropoietin-Stimulus auf morphologisch als noch nicht zur Erythropoiese gehörig erkennbare Zellen führt auch ohne weitere Erythropoietin-Zufuhr zur Ausreifung bis zum Reticulocyten. Dies zeigte FILMANOWICZ (32) an übertransfundier-

ten Mäusen, deren Knochenmark praktisch keine Erythroblasten mehr enthält. Stunden nach der Erythropoietin-Injektion erscheinen Proerythroblasten und die weitere Ausreifung in Form einer "erythropoietischen Welle".

Erythropoietin wirkt nach GORDON et al. unmittelbar auf die Reticulocytenausschwemme (57) und führt zu einer Verkürzung der Generationszeit der Erythroblasten durch Einwirkung auf die DNA-Synthese (100, 111).

Die erste Reaktion ist bei Einwirkung von Erythropoietin auf das Knochenmark eine Vermehrung der Ribonucleinsäure. Es wird angenommen, daß aufgrund einer genetischen Information der DNS des Zellkerns durch den Erythropoietin-Stimulus eine Messenger-RNS gebildet wird. Dadurch wird die Hämoglobin-Synthese eingeleitet (122).

IV. KLINISCHE BEDEUTUNG VON ERYTHROPOIETIN

Die Erythropoietin-Bestimmung ist differenzial-diagnostisch bei Polyglobulien wertvoll, da Erythropoietin bei sekundärer Polyglobulie infolge kardialer oder respiratorischer Insuffizienz im Serum und Urin erhöht ist, nicht jedoch bei der Polycythaemia vera (132).

Beschränkt differenzial-diagnostisch verwertbar ist sie bei erythropoietin-produzierenden Tumoren wie Adenomen, Hämangiomen, Sarkomen, Karzinomen und Willms-Tumoren der Niere (132).

Eine erhöhte Erythropoietin-Sekretion findet sich ferner bei Kleinhirnangiomen, Phäochromozytom, Hydronephrose, Nierenarterienstenose oder bei Abstoßungskrisen im Anschluß an eine Nierentransplantation (132).

Besonders hohe Erythropoietin-Aktivität weisen Patienten mit aplastischen Syndrom bei "leerem" Mark auf (129) sowie Patienten mit isolierter Aplasie der Erythropoiese.

Die Erythropoietin-Sekretion ist vermindert bei neoplastischen oder schweren entzündlichen Erkrankungen mit kataboler Stoffwechsellage (137), da Eiweißmangel die Erythropoietin-Sekretion vermindert (69). Auch bei Anämien infolge Hypothyroidismus oder Hypophysenausfalls führt der verminderte O_2-Bedarf zu einer ESF-Reduzierung.

Therapeutisch ist Erythropoietin wegen der Unreinheiten der Präparate noch nicht verwendbar. BURLINGTON et al. (8) versuchen jedoch, aus Zellkulturen von Glomerulaepithelien geringen Mengen hochreinen Erythropoietins zu gewinnen. ESSERS et al. versuchten, durch erythropoietin-reiche Plasma-Infusionen die Erythropoiese von Patienten mit renaler Anämie durch Auslösen einer Retikulocytenkrise zu stimulieren. Dies führte jedoch nur zu relativ bescheidenen Erfolgen, da die retinierten harnpflichtigen Substanzen zu einer Hemmung der Proliferation der Erythropoiese führen (29, 30).

REISSMANN et al. zeigten an mit dem Zytostatikum Myleran vorbehandelten Mäusen, daß Erythropoietin auch bei durch Zytostatica verursachten Markinsuffizienz die Erythropoiese stimulieren kann (114).

Durch Androgene oder Anabolica und die dadurch eintretende Erythropoietin-Stimulierung werden teilweise langanhaltende Besserungen bei verschiedenen Anämieformen erreicht (122). Es wird auch an den Einsatz eines Erythropoietin-Antiserums gedacht zur Behandlung der Polycythaemia vera (122).

V. EINHEITS-BEZEICHNUNGEN UND STANDARDS

1. ESF-Einheit bzw. CS-Einheit

Bei KEIGHLEY et al. (78) ist die "ESF-Einheit" definiert als diejenige Menge an Erythropoietin, die bei der hungernden Ratte einen Nettoanstieg der Fe^{59}-Inkorporation von 20 % erzeugt, wobei unter Nettoanstieg die Differenz zwischen der prozentualen Eisenaufnahme in die Ratten-Erythrocyten nach Injektion eines inaktiven Materials und nach Injektion des erythropoietinhaltigen Materials zu verstehen ist.

In späteren Arbeiten verwenden KEIGHLEY bzw. VAN DYKE für den Begriff ESF-Einheit die Abkürzung "C.S.-Einheit" (CS = Comparative Standard) (76).

2. Aktivitätseinheit bzw. Cobalt-Einheit

WHITE et al. (120) nennen diejenige Menge Erythropoietin, die bei der hungernden Ratte eine gleichhohe Steigerung der Inkorporation von Fe^{59} in die Erythrocyten bewirkt wie die Injektion von 5 /uM Cobaltionen, eine "Aktivitätseinheit" (Cobalt-Einheit).

3. H.R.-Einheit

GORDON führte die H.R.-Einheit ein. Sie ergibt sich durch Summierung des prozentualen HK-Wertes mit der Reticulocytenzahl (55). Eine H.R.-Einheit entspricht 1,2 - 1,3 Cobalt-Einheiten (59).

4. Die internationale Einheit = IU = IE

Die IU wurde definiert als die Menge, die in 0,50 mg der Second IRP vorhanden ist (3). Sie ist heute die gebräuchliche.

Definition: Eine Einheit Erythropoietin ist definiert als die Aktivität, die in 1/10 des Inhalts einer Ampulle des IRP vorhanden ist (47).

5. Der International Reverence Preparation of Erythropoietin bzw. Erythropoietin Standard B = IRP = ESB

Das Erythropoietin wurde aus menschlichem Urin anämischer Patienten gewonnen und als Trockenampullen geliefert, wobei jede Ampulle 10 Einheiten Erythropoietin, verglichen an ESA, enthielt. Dies wird 1966 von COTES und BANGHAM berichtet (17). Er sollte zur Kalibrierung für einen Laborstandard bzw. für den Bioassay verwendet werden.

6. The second International Reference Preparation of Erythropoietin = second IRP

Das Präparat wurde nach der Kollodium-Adsorptions-Methode aus dem Urin von anämischen Patienten gewonnen. In jeder Ampulle

befinden sich ungefähr 2 mg Trockenextrakt aus ca. 4 mg Urinkonzentrat plus 3 mg Sodium-Chlorid. An Erythropoietin sind davon 7,6 bis 12,4 IU enthalten (3).

Er dient als Standard für die Sheep plasma erythropoietin preparation (68/307).

Das WHO Expert Committee on Biologico Standardication führte 1972 den second IRP for ESF als einen Ersatz für den first IRP for ESF ein. Jede Ampulle enthält 10 IU Erythropoietin.

7. Scheep plasma erythropoietin preparation (68/307)

Als Material dienten 2000 IU Schafplasma Erythropoietin "AL - 0334 K 147048", aufbewahrt in 8 Fläschchen mit Gummi-Verschluß. In jedem Fläschchen waren ca. 148 mg Trockenmaterial (Step 3). Nach Auflösung in H_2O mit Lactose und Zentrifugierung wurde jede Ampulle mit 0,978 g dieser Lösung versehen, in flüssigen Stickstoff gefroren und gefrier-getrocknet. Schließlich erfolgte im Vakuum bei 20° C eine Trocknung auf ein konstantes Gewicht über Phosphor-V-Oxyd und Auffüllung der Ampulle mit N_2. Nach Versiegelung wurden die Ampullen bei Dunkelheit und - 20° C aufbewahrt.

In jeder Ampulle sind ca. 10 mg Material enthalten, das sich aus Protein, Salz und 5 mg Lactose zusammensetzt und pro Ampulle eine Aktivität von 14 bis 22 IU aufwies. Für Versuche wurden 18 IU festgelegt (3).

VI. METHODEN DER ERYTHROPOIETIN-QUALIFIZIERUNG UND -QUANTIFIZIERUNG

1. Bioassays

1.1 in vivo Assays

a) Parameter

Früher wurden als Kriterien zur Bestimmung der Erythropoietin-Aktivität von Serum, Plasma, Urinfraktionen oder Gewebeextrakten einmal die Blutparameter der peripheren roten Blutkörperchen (Erythrocyten-Auszählung, HB, HK, Retikulocyten-level), die kernhaltigen Vorstufen der Erythrocyten in den blutbildenden Organen (7, 58) sowie zum andern das Gesamterythrocytenvolumen an Ratten genommen (43). Mit Messungen der Fe^{59}-Inkorporation in die Erythrocyten wurde von JACOBSON et al. (37, 109) ein einfacheres, sensibleres Kriterium eingeführt. Dabei gingen sie von den Ergebnissen HUFFs aus, daß radioaktives Eisen beim Versuchstier größtenteils in die neugebildeten Erys eingebaut wird und aus dem Hämoglobin-Molekül nicht mehr mit dem Plasma ausgetauscht werden kann (67).

b) Methoden, die Erythropoietin-Sensibilisierung heraufzusetzen

Bei den Empfängertieren (Hasen, Ratten, Mäusen, Affen, Meerschweinchen) wurde durch verschiedene Methoden die Empfindlichkeit für die Erythropoietin-Präparate heraufgesetzt.

1. Hunger und/oder Hypophysektomie bei Ratten sollte die endogene Erythropoietin-Rate senken (63).

2. Transfusion von Erythrocyten:

Es kommt zu einer Polyglobulie, die Erythropoiese wird gedrosselt. GURNEY et al. (62) halten die polyglobule Maus für das bestgeeignetste Empfängertier.

3. Hyperoxie:

FRIED et al. (38) setzten Ratten 7 Tage lang einer Athmosphäre mit einem O_2-Gehalt von 85 bis 95 % aus und stellten einen Rückgang der Fe^{59}-Inkorporation von 32 % auf 8 % fest. Nach Injektion von erythropoietin-haltigem Plasma stieg die Fe^{59}-Inkorporationsrate von 34 % auf 46,5 % an.

Nach 2-wöchiger Hyperoxie führte dies zum Tod aller Ratten.

4. Subletal bestrahlte Tiere:

Durch massive Röntgen-Bestrahlung kommt es zu einer schweren Schädigung der Erythropoiese. Auf exogenes Erythropoietin zeigen subletal bestrahlte Ratten eine größere Empfindlichkeit als normale Ratten (128).

5. Hypoxie:

Zunächst tritt eine Reticulocytose, danach eine Polyglobulie ein.

Man erreicht die Polycythämie durch

α) Aussetzen der Maus in einem auf 0,5 atm oder weniger evakuierten Tank (16, 4),

β) durch ein Gasgemisch mit 10 % O_2 bei Normaldruck (5),

γ) durch geringe Mengen CO (35) und

δ) durch einen schrittweise abnehmenden O_2-Partialdruck dadurch, daß man die Maus in eine Silikon-Gummi-Zelle bringt, die für CO_2 eine größere Permeabilität besitzt als für O_2 (90).

Nach 2 Stunden (125) bzw. 8 Stunden (112) läßt sich bei herabgesetztem Athmosphärendruck im Blut eine deutliche Erythropoietin-Aktivität feststellen, die nach 16 bis 24 Stunden ihren Gipfelwert erreicht und dann wieder absinkt. Nach 72 bis 90 Stunden ist der Erythropoietin-Wert nicht mehr meßbar. Bei Herausnahme geht der Erythropoietin-Spiegel innerhalb von 24 Stunden auf den Nullwert zurück (125). Bei 450 mmHg läßt sich bei Versuchen an Ratten keine Erythropoietin-Aktivität mehr feststellen (127).

Es ist wichtig, nach der Herausnahme der Mäuse aus der Druckkammer die durch die Anoxie infolge des erhöhten Erythropoietin-Titers gebildeten Frühformen der Erythrocyten ausreifen zu lassen. Mäuse, die an Tag 1 aus der Unterdruckkammer genommen wurden und an Tag 4 Fe^{59} injiziert bekamen, hatten eine Eiseneinbaurate von 11 %, Mäuse, die am Tag 8 Fe^{59} injiziert bekamen, dagegen nur eine Einbaurate von 0,6 % (170).

Es gibt viele Varianten der Bioassays. Heute werden jedoch die gebräuchlichsten Verfahren mit Hungerratten oder mit polycythämischen Mäusen durchgeführt.

Der Assay mit den Hungerratten gestaltet sich kürzer und ist

weniger kompliziert als der Assay mit den polycythämischen Mäusen. Dieser ist jedoch 10 - 20 mal empfindlicher (48).

1.2 in-vitro-Assays

Die Grundlage für die in-vitro-Assays bildet die Feststellung, daß bei Zugabe von Erythropoietin durch die Zellen von Ratten-Knochenmark-Kulturen ein erhöhter Fe^{59}-Einbau stattfindet und eine direkte Abhängigkeit zwischen der angewandten Menge an Erythropoietin und dem Anstieg des Einbaus besteht (83, 40). Hiermit kann KRANITZ an menschlichen Knochenmark-Kulturen Erythropoietin von Menschen und Schafen in Höhe von 0,05 IU bestimmen (82).

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangt WARD mit Knochenmark-Kulturen von Hunden (136).

Durch eine Modifizierung erreichte GOLDWASSER und ELIASON Erythropoietin-Werte um 0,001 IU (46).

Eine andere Methode beschreiben STEPHENSON und AXELRAD (124), basierend auf der Methode nach COLE und PAUL (14). Sie benützen Leberzell-Kulturen von 13-Tage alten Mäusefetus und versehen diese mit Erythropoietin. Die Antwort auf Erythropoietin besteht in einem linearen Anstieg der Häm-Synthese (gemessen am Eiseneinbau) zu einem logarithmischen Anstieg von Erythropoietin. Damit können Erythropoietin-Werte von 0,001 IU/ml Kulturmedium erfaßt werden (124).

Außer der Fe^{59}-Inkorporation dienen als weitere Parameter bei den

Gewebe-Kulturen die RNA-Synthese (61), sowie die Glucosamin-Irkorporation (21).

2. Immunochemische Methoden

2.1 Hemagglutination-Inhibitions-Assay (89, 86)

Beim Hemagglutination-Inhibitions-Test (HAI) nach LANGE (86, 89) bildet der Wettbewerb der reaktiven Antigene (Proteine) zu den Antikörpern die Grundlage für die indirekte quantitative Messung von Proteinen und Peptid-Hormonen.

Mit einem spezifischen Antikörper, der die Agglutination (HA) der sensitivierten roten Blutkörperchen veranlassen kann, werden die Werte des Hormon-Standard-Präparats und der Test-Substanz, die die Agglutination verhindert, gemessen und verglichen.

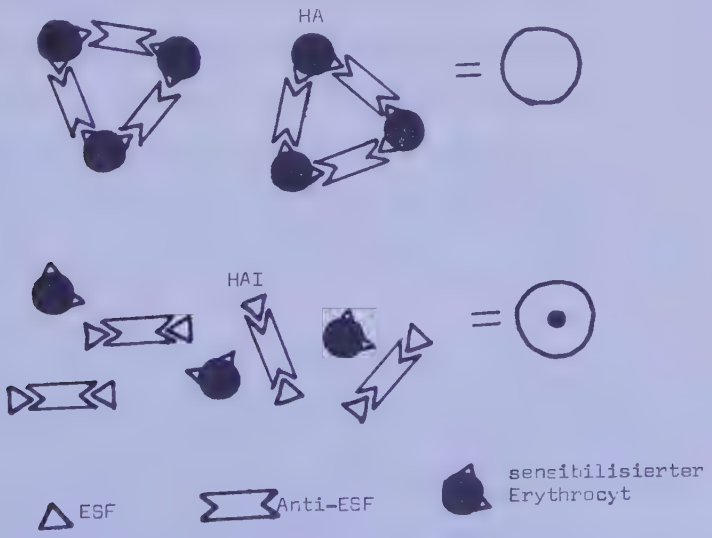

Abb. 4: Prinzip der Hämagglutination und Hämagglutination-Inhibition-Reaktion (87)

Für diesen Test benötigt man

a) ein hemagglutinierendes Antiserum zu Erythropoietin
b) Erythrocyten als Indikator
c) ein Antigen zur Sensitivierung der Erythrocyten
d) ein Hormon-Standard-Präparat

Die Immunisierung an Kaninchen wurde nach der Methode von SUEOKA und CHENG (131) mit einem Komplex aus heißdenaturiertem Erythropoietin und methyliertem Albumin vorgenommen.

Da durch die Säuberung von Nicht-Anti-Erythropoietin-Antikörpern auch einige Anti-Erythropoietin-Antikörper verlorengingen, verbesserte LANGE die Ausbeute durch HA-Tests mit der Verwendung von Erythrocyten, die er nach einem Verfahren von SANDSON et al. (118) mit normalem menschlichem Serum sensitivierte.

Heutzutage finden Erythrocyten der menschlichen Blutgruppe O Verwendung, die 3-mal mit 0,15 Molaren Natrium Clorid-Lösung gewaschen und in ACD gesammelt werden.

Gute Ergebnisse für die Sensitivierung der Erythrocyten geben die Vorbehandlungen der Erythrocyten mit Tannensäure-Formalin (72), Chromchlorid (45) und die Fixation der Erythrocyten mit Glutaraldehyd vor der Gerburg und Sensitivierung (87).

Das für die Immunisierung, die Sensibilisierung und das Standard-Präparat benötigte Erythropoietin wird, modifiziert nach der chromatographischen Methode von LEWIS et al. (79), aus dialysiertem Urin von Patienten mit einem hohen Erythropoietin-Titer gewonnen. Zur Sensibilisierung der Erythrocyten und als Bezugs-

Präparat sind besonders hoch gereinigte Erythropoietin-Präparate nötig, die als $ESF^{B}3$ bezeichnet werden (87). LANGE erreichte mit dieser Methode 0,5 bis 2,0 units/ml Serum (86).

Inzwischen sind ganze HAI-Sets für die Bestimmung von Urin-Erythropoietin im Handel (J.C.L. Clinical Research Co., Knoxville, Tennessee) (79).

Für Bestimmungen des Serum-Erythropoietins ist diese Methode jedoch ungeeignet.

2.2 Radioimmun-Assay

FISCHER et al. entwickelten 1971 einen Radioimmun-Assay, nachdem sie aus dem Urin von Patienten aus Corrientes, Argentinien, die infolge von Hakenwurm-Befalls an sekundärer Anämie litten, hochreines Erythropoietin gewinnen konnten (34).

Hierbei wurden zur Reinigung des menschlichen Urin-Erythropoietins mehrere Fraktionierungen nach einem Verfahren von ESPADA und GUTINSKY durchgeführt (27, 26). Das Erythropoietin-Antiserum (Anti-ESF) wurde nach der Methode von KABAT und MAYER (73) bei Albino-Neuseeland-Hasen gewonnen, denen ungereinigtes Urin-Erythropoietin eines Patienten mit einer reinen Erythrocyten-Aplasie injiziert wurde.

SCHOOLEY et al. schlagen vor, das Immunserum der Kaninchen zu dem Zeitpunkt zu gewinnen, an dem der HK und der Reticulocyten-Level gerade beginnen, herabgedrückt zu werden (121). Zu diesem Vorschlag führten Beobachtungen, daß es auf die Immunisierung hin zu einer Anämie kommt und das darauf endogen gebildete Erythropoietin

das Immunserum des Kaninchens neutralisiert (42).

In Testen an polycythämischen Mäusen, denen größere Mengen Serum mit Anti-Erythropoietin injiziert wurden, zeigten sich öfters toxische Reaktionen, vor allem bei seit mehreren Monaten eingefrorenen Seren (121).

Mit dem Anti-ESF des Immunserums von Kaninchen, die durch Behandlung mit menschlichen Urin-ESF gewonnen wurden, ließ sich die biologische Aktivität von Serum- oder Plasma-Erythropoietin von Mäusen, Ratten, Schafen und Menschen neutralisieren (42).

In dem sich anschließenden Bioassay an exhypoxisch, polycythämischen Mäusen nach einer modifizierten Methode von COTES und BANGHAM (16) neutralisierte annähernd 0,1 ml Anti-Erythropoietin, das in verdünnten normalen menschlichen Plasma absorbiert war, die biologische Aktivität von 0,2 units menschlichen Erythropoietins.

Das Prinzip des Radioimmun-Assays ist der Wettkampf von radioaktiv markiertem und nicht markiertem Hormon um einen spezifisch bindenden Platz am Antikörper. Am Antikörper werden umso weniger radioaktiv markierte Hormone gebunden werden können, je mehr unmarkierte Hormone vorhanden sind.

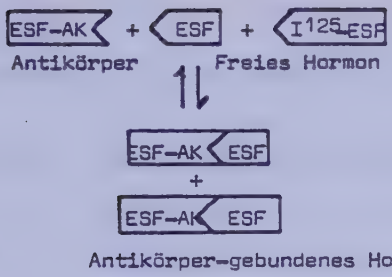

Abb. 5: Prinzip des Radioimmunassays (34)

Nach einer Technik von HUNTER und GREENWOOD (121) wird das gereinigte Erythropoietin jodiert, durch eine Sephadex G-100-Säure geschickt und das markierte Erythropoietin von dem schadhaften Protein und den freien Jodionen getrennt (34).

Dieser Radioimmun-Assay erfaßt Erythropoietin-Werte von 0,045 mU (25 ng). FISHER konnte im 24-h-Urin von 3 gesunden Menschen Erythropoietin-Mengen von 4,93 bis 30 mg feststellen, bei 4 Anämie-Patienten zwischen 72,5 und 303 mg.

GARCIA erhielt mit dem Radioimmun-Assay zwischen 4,5 und 11,0 mU/ml Plasma (41).

VII. REINDARSTELLUNG VON ERYTHROPOIETIN

ESPADA und GUTINSKY entwickelten ein Verfahren, hochgereinigtes Erythropoietin aus Urin von Patienten mit Anämie infolge Bandwurmbefalls zu gewinnen, bei denen der Erythropoietin-Titer besonders hoch lag.

Das Verfahren sieht so aus:

1. Ausfällung des Proteins im Urin mit Benzoesäure und Äthanol
2. Fraktionierung mit DEAE-Cellulose (0,17 Molaren Natrium Clorid-Lösung)
3. Konzentrierung der erythropoietisch aktiven Fraktionen durch Hydroxylapathit
4. Fraktionierung an einer Sephadex G-25-Säule
5. Fraktionierung an DEAE-Cellulose (0,05 Molare Tris-Maleat); Hinzufügurg von EDTA
6. Fraktionierung mit Sephadex G-100 (geschätzte Erythropoietin-Aktivität: 2000 bis 3000 internationaler Einheiten je mg Protein
7. weitere zweimalige Fraktionierung der erythropoietinaktiven Fraktionen mit Sephadex G-100 (geschätzte Erythropoietin-Aktivität ca. 8300 IU/mg Protein) Ertrag 5 - 10 % (in Anlehnung an 34)
8. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (28)

Mit der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (28) wurde die biologische Aktivität in einem einzigen Band lokalisiert. Es setzt sich zusammen aus 65,5 % Protein, 13,0 % Hexosen, 8,9 % Hexosamin und 7,5 % HCl. An Aminosäuren sind in der Erythropoietin-Fraktion Asparagin-Säure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Prolin, Glycin, Histidin, Lysin und Arginin zu trennen (28).

Durch Proteasen und/oder Sialidasen erweist sich Urin-Erythropoietin bei der Fraktion als ziemlich unstabil. Um dies zu verhindern, wird das Erythropoietin nach der Extraktion in Phenol ge-

leitet und anschließend mit Alkohol ausgefällt (95, 11).

Weitere Ursachen für die Unstabilität und damit Aktivitätsverluste sind die Entsalzungsvorgänge bei der Gel-Filtration und die Dialyse. Um die sonst notwendige Entsalzungen zu umgehen, wendeten KAWATI et al. (75) eine Kombination aus Ca-Phosphat-Gel- und anschließender Sephadex-Gel-Chromatographie an.

In weiteren Variationen dieser Fraktionierungsreihe erhielten ESPADA et al. (27, 28) hochgereinigtes Erythropoietin mit einer Aktivität von 8000 IU aus dem Urin von Patienten mit paroxysmaler Nokthämoglobinurie, was einem Reinigungs-Faktor von ungefähr 300 entspricht (46).

Neueste noch nicht veröffentlichte Versuche von MYAKE, KUNG und GOLDWASSER konnten von Patienten mit aplastischer Anämie eine Mindest-Aktivität von 20 000 U/mg Protein feststellen (47).

SUSUMU IKEGAMI et al. konnten aus dem Urin-Präzipitat zweier Patienten mit aplastischer Anämie mittels einer Elektrofokusier-Methode in einer LKG 8101-Säule eine 380-fach höhere Erythropoietin-Aktivität erreichen (68) als diese im Präzipitat vorhanden war.

VIII. HARNEINENGUNGS-VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON ERYTHROPOIETIN

1. Perevaporation

Die Perevaporation wurde zu Beginn der 60er Jahre von Kreisen um

GALLAGHER durchgeführt. Normales Menscherserum wurde mit physiologischer Kochsalz-Lösung oder normalen menschlichen Urin verdünnt. In Visking Schläuchen Nr. 36 wurden sie bei 4° C aufgehängt und mit dem elektrischen Föhn angeblasen. Zu einer Konzentrierung von 100 ml auf 5 ml gelösten Serums benötigte man 5 - 7 Tage. Die Gesamt-Proteinwiederfindung betrug 60,0 $\pm$ S.D. 22,03 % (105).

Sie führte jedoch zu Eiweißdenaturierungen und wurde deshalb bald wieder aufgegeben (39, 88, 93, 126).

2. Gefriertrocknung

FINNE (33) sowie ADAMSON et al. (1) verwendeten zur Harneingung die Gefriertrocknung. Das durch Dialyse gegen Carbowax 20-M auf 50 ml eingeengte Urin-Konzentrat wurde bei - 18° C in sterilen Test-Röhrchen in 4 Portionen aufbewahrt. Ein Aktivitätsverlust blieb aus (1).

Ein durch viele andere verunreinigende Proteine Erythropoietin-Präzipitat, das bei - 20° C jahrelang gelagert werden kann, ist nach einem Verfahrer von LOWY und KEIGHLEY zu gewinnen (95). Dem bei 5° C einige Tage gelagerten 24-h-Urin werden 3 Einheiten kalten Acetons oder 4 Einheiten Alkohol zugegeben. Am nächsten Tag wird der Überschuß dekantiert, das Präzipitat mit einer Wasserstrahlpumpe in einem Buchner-Trichter gesammelt, in kalten Aceton und Äther gewaschen und getrockret.

Bei der Gefriertrocknung ist die Gesamteiweißwiederfindung gut und das immunelektrophoretische Verhalten nur ein wenig variiert

(13, 119). Werden die Proteine komplett getrocknet, treten irreversible Schäden auf und eine Lösung des ganzen Materials ist nicht mehr möglich (66). Trotz eines raschen Einfrierens kommt es zu Aggregatsbildungen (107), Wasserentzug und pH-Änderungen (72). Die Gefrierdenaturierung ist jedoch gering (12, 18).

3. Dialyse

Die Harneinengung mit diesem Verfahren wird mit semipermeablen Membranen durchgeführt, durch die infolge eines Konzentrationsgefälles gegen die höherosmolaren Außenlösungen die flüssigen Bestandteile sowie die Partikel mit kleinerem Umfang als die Porengröße der Membranen nach außen diffundieren. Das Harnkonzentrat bleibt in den Schläuchen zurück.

ADAMSON et. al. (1) entzogen dem Urin, den sie in Dialysierschläuche mit 10 A^{o} Porengröße gaben, das Wasser sowie manche dialysierbaren Stoffe. Die Schläuche waren in Carbowax 20-M, einem Polyäthylenglycol, gebettet.

GOLDWASSER verwendete an Stelle von Carbowax Carboximethyl-Cellulose. Bei beiden mußten jedoch erhebliche Verunreinigungen des Präparates in Kauf genommen werden. LEWIS et al. (92) untersuchte Dialyse-Schläuche aus Visking Cellulose verschiedenen Durchmessers. Die meisten Schläuche waren nur wenig permeabel, die mit einem Innendurchmesser von 1 7/8 inch jedoch bewies durch einen zweifachen Anstieg der spezifischen Aktivität im Diffusat eine selektive Permeabilität für Erythropoietin.
Das Dialyseverfahren hat den Vorzug eines relativ geringen Arbeits- und Zeitaufwands.

4. Präzipitation mit Äthanol

LOWY et KEIGHLEY gewannen Erythropoietin durch Ausfällung mit 4 Teilen alkoholischem Burroughs Äthanol 99,5 % (- 20° C) zu einem Teil Urin. Das Präzipitat wurde in 3 molarer Sodiumchlorid-Lösung auf das 20-fache des Ausgangsvolumens an Urin reduziert (96).

5. Präzipitation mit Benzoesäure

ESPADA und GUTINSKY fügten einem mit HCl auf pH5 gebrachten Urin eine alkoholische Benzoesäure-Lösung tropfenweise bei und erhielten ein Erythropoietin-Präzipitat. Das vom Alkohol gereinigte Präzipitat wurde mit Phosphat-Puffer auf pH 7,2 gebracht (26).

6. Ultrafiltration

6.1 Mikroporenfilter

Bei diesen Filtern können durch die präformierten Poren alle Stoffe dem Druckgefälle entsprechend passieren, die einen kleineren Radius besitzen als die Poren. Dabei wurden Visking-Cellulose-Schläuche bei Unterdruck angewandt. Durch Adhäsion an der Membranoberfläche kam es zu Eiweißverlusten (105).

Schon 1945 wurde von GORBMANN (17) die Ultrafiltrationstechnik mit der Collodium-Membran zur Urinkonzentrierung durchgeführt und seitdem viel variiert.

MIYASATOR und POLLAK gewannen unter Hochdruck aus 100 ml des verdünnten Serums durch eine Collodium-Membran LSG Nr. 60 bis 8

Stunden 5 bis 10 ml Konzentrat. Um eine gelatineartige Veränderung des Konzentrats zu verhindern, die eine Trocknung unmöglich machten, wurde dieses anschließend gegen destilliertes Wasser dialysiert (105).

6.2 Polyionenmembranen

Diese Hydrogel-Membran arbeitet nach dem Prinzip der molekularen Diffusion. Die primären Polymere (Polyanionen, Polykationen) dieser Membran werden durch Ionenbindung zusammengehalten (102). Die Ketten des Netzwerkes oszillieren und verbinden sich vorübergehend mit den transportierten Molekülen. Diese und das Lösungsmittel werden durch die Braun'sche Molekular-Bewegung der Ketten durch die Membran transportiert.

POLLAK verwendete die Amicon-Modelle 400 (400 ml) und 50 (60 ml) und die Diaflo-Ultrafiltrationsmembran Type UM-1, die alle Substanzen mit einem Molekular-Gewicht von größer als 10 000 zurückhält. Mit den Methoden der Elektrophorese, Immunelektrophorese und der quantitativen Immunidiffusion war im Vergleich Nativ- zu konzentriertem Serum die Proteingesamtwiederfindung 94,5 $\pm$ S.D. 3,15 %. Die Wiederfindung aus Gesamtprotein bei 10 Patienten mit Proteinurie lag bei 94,8 $\pm$ S.D. 20,3 % (110).

XI. EIGENES METHODISCHES VORGEHEN

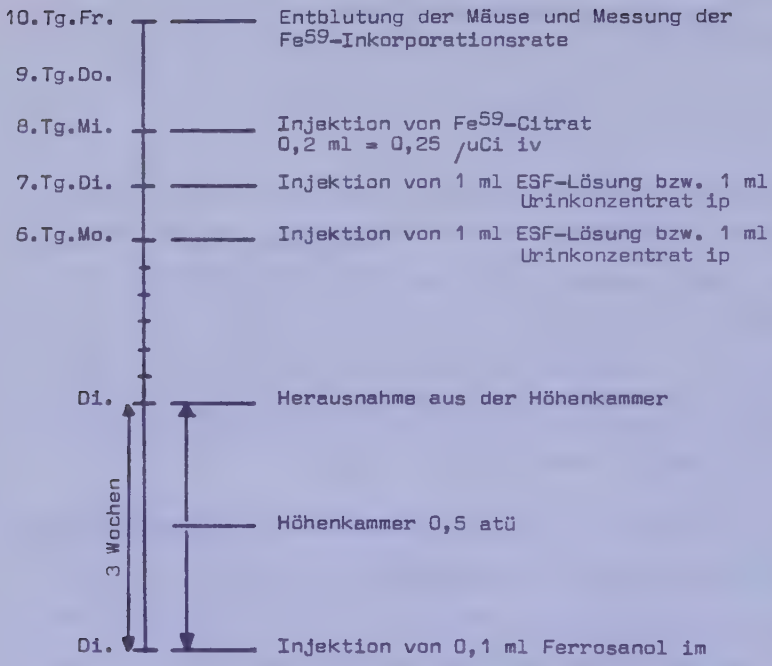

Abb. 6: Zeitlicher Ablauf unserer Versuche

1. Urin

Wir sammelten den 24-h-Urin von Kindern unserer Klinik in sauberen Polyäthylenflaschen, denen wir zur Erhaltung des Urins 275 mg Streptomycin und 250 000 I.E. Pennicilin-G hinzusetzten. Dabei achteten wir auf ein einheitliches Zeitmaß, indem die Kinder am 1. Tag um 8.00 Uhr bis zum nächsten Tag um 8.00 Uhr ihr Wasser

ließen. Anschließend wurde der Urin in einer Gefriertruhe bei - 18° C eingefroren.

2. Urin-Einengung

Zur Weiterverarbeitung ließen wir die Urine in der Kühlkammer bei + 4° C auftauen.

Die grobe Filtrierung wurde mit Selecta-Filtern Nr. 595 der Firma Seva (Heidelberg) durchgeführt, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen wurden. Anschließend erfolgte die jeweilige Einengung des Urins auf 24 ml.

Wir bedienten uns dabei der Ultrafiltrationsmethode mit einem Gerät der Firma Amicon (Gerät Nr. 402).

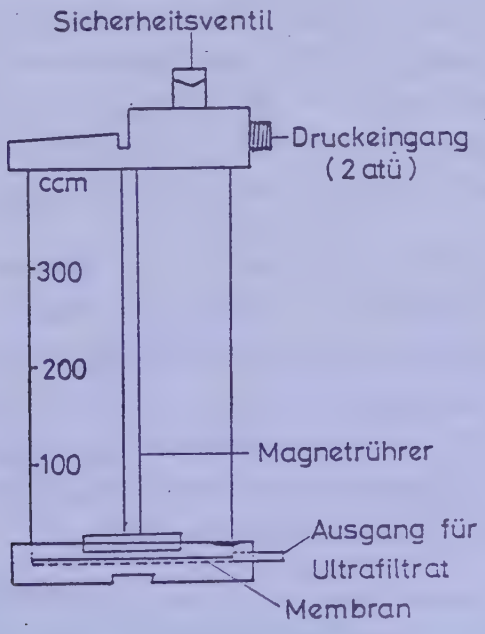

Abb. 7: Ultrafiltrier-Gerät Amicon Nr. 402

Dieses umfaßt ein Volumen von 400 ml und besteht hauptsächlich aus einem sterilisierbaren Kunststoffboden, -zylinder und -verschlußteil, die mit einer Metallkammer zur Zelle zusammengebaut werden können. Weil bei dieser Methode Überdruck angewandt wird und das Gerät für ein Druckmaximum bis 5 atü konstruiert ist, befindet sich auf dem Verschlußteil ein Sicherheitsventil.

Mittels eines Stickstoff-Überdrucks von 2 atü wird der Urin durch die von uns verwandte Amicon-Diaflo-Ultrafiltrationsmembran PM-10 gedrückt, die alle Stoffe mit einem Molekulargewicht von $>$ 10 000 MG in der Zelle zurückhält und das proteinfreie Ultrafiltrat passieren läßt.

Der Stickstoff wird von einer N_2-Flasche über den Druckeingang der Zelle zugeführt. Um einen wasserundurchlässigen Proteinfilm über der Membran zu verhindern, wird das Gerät auf einen der üblichen Magnetrührer gestellt, der jedoch nicht zu schnell rotieren darf, um ein Aufschäumen des Rückstandes zu vermeiden.

Da manchmal Urine bis 1 200 ml aufbereitet werden mußten, war es notwendig, die Zelle mehrmals aufzufüllen. Dazu wurde die N_2-Flasche abgedreht, über das Sicherheitsventil durch langsames Aufdrehen Druckausgleich erzielt und über einen Trichter Urin in die Öffnung geleert, die durch Herausnahme des Ventils frei wurde. Der auf 24 ml eingeengte Harn wurde mit einer Pipette der Zelle entnommen und in Reagenzgläschen eingefroren.

Die Polyionenmembran arbeitet nach dem Prinzip der molekularen Gel-Diffusion. Die effektive Oberfläche dieser Membran beträgt

39,2 cm^2, ihr Durchmesser 76 mm. Da sie zum Schutz gegen Austrocknung vom Hersteller mit einem Glycerinfilm versehen wurde, mußte die Membran 1 Stunde vor Gebrauch mehrmals mit destilliertem Wasser ausgespült werden.

Menschliches Erythropoietin hat nach E. GOLDWASSER ein Molekulargewicht von ungefähr 46 000 MG und wird deshalb mit dieser Methode sicher zurückgehalten.

3. Bioassay:

Zur Bestimmung des Erythropoietin-Gehaltes im 24-h-Urin-Konzentrat bedienten wir uns des Bioassays nach P.M. COTES und D.R. BANGHAM, die 1961 über einen Versuch an Mäusen berichteten, welche sie durch Einbringen in eine Höhenkammer polycythämisch machten (16). Der Erythropoietin-Gehalt wurde über die gemessene Fe^{59}-Inkorporationsrate bestimmt.

3.1 Tiermaterial:

Die 6 - 8 Wochen alten weiblichen NMRI-Mäuse der Tierversuchsfarm Ivanovas in Kisslegg/Allgäu wogen 25-30 g. Sie bekamen im vollklimatisierten Tierstall der Kinderklinik Altromin-Pellets und Leitungswasser ad libitum. Zu Beginn des Versuches wurde jeder Maus 5 mg Ferrosanol der Firma Sanol i.m. gespritzt, ein Ferroglykokollsulfatkomplex. In 1 ml sind 50 mg Fe enthalten.

3.2 Höhenkammer:

Anschließend wurden die Tiere 21 Tage lang in einer Höhenkammer

einem Athmosphärendruck von 450 mmHg ausgesetzt, was einer Höhe von 5 500 m über dem Meer entspricht. Dabei erhielten sie täglich einmal frisches Leitungswasser und Altromin-Pellets.

Die Höhenkammer wurde nach Plänen der Zentralwerkstatt Ulm aus einem ausgedienten Dampfsterilisator von der Werkstatt unserer Kinderklinik gebaut.

Zur Evakuierung - in 7-10 Minuten erreicht - diente eine Vakuumpumpe der Firma Leybold, der sich ein Filter und Kondensatabscheider anschlossen.

In der hermetisch verschließbaren Höhenkammer war eine Schwachstrombeleuchtung angebracht. Für konstante Druckverhältnisse sorgte ein Sicherheits- und Ansaugregulierungsventil. Druck und Temperatur wurden von einem Manometer und Thermometer angezeigt, die außerhalb der Kammer abzulesen war.

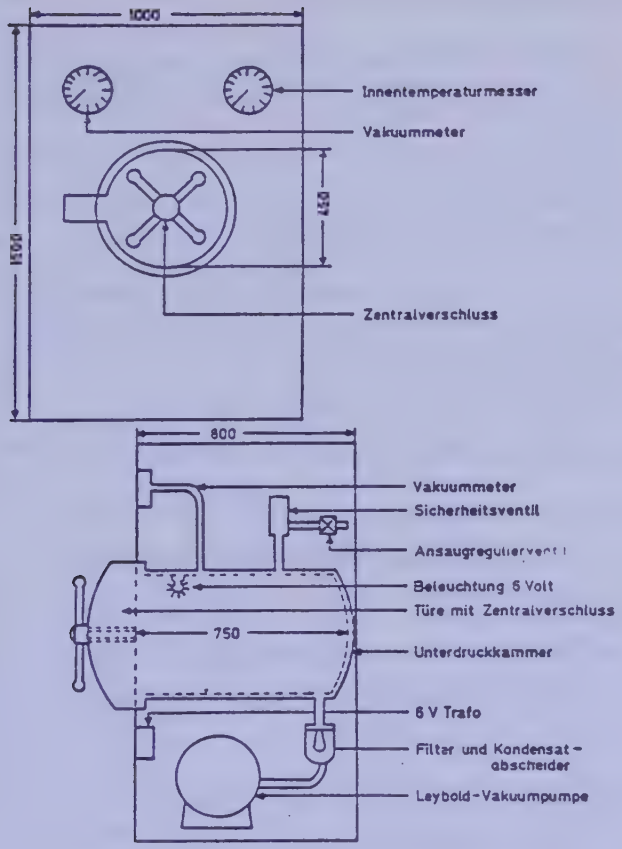

Abb. 8: Unterdruckkammer nach Plänen der Zentralwerkstatt Ulm

Nach dieser 3-wöchigen Hypoxie wurden die Mäuse 6 Tage lang unter normalen Luftdruckverhältnissen im Tierstall gehalten.

3.3 Herstellung der Standard-Konzentrationen:

Zur Herstellung der Standard-Kurve verwendeten wir ein Erythropoietin-Präparat der Firma Arnold R. Horwell, London.

Daten: Erythropoietin Step 1 (CMRL)
gefrier-getrocknet
präpariert aus Plasma phenylhydrazin-behandelter Schafe
Fläschchen-Inhalt: 300 E
Netto-Gewicht: 600 mg.

Connaught medical research Laboratories 1755 Steeles Ave W., Willowdale-Ontario-Canada (University of Toronto).

Dabei entspricht 1 mg des Präparates 0,5 E Erythropoietin.

Wir lösten die für die Konzentrationen 0,2 , 0,4 , 0,6 , 0,8 , 1,0 , 1,2 , 1,4 E jeweils erforderlichen Mengen in 0,9 %-iger Natrium-Chlorit-Lösung.

Am 6. und 7. posthypoxischen Tag erhielt jedes Tier (5 Tiere je Konzentrationsschritt) 1 ml der Erythropoietin-Lösung ip gespritzt.

Die übrige Behandlung unterschied sich nicht von der der Tiere mit den ip-gespritzten Urinkonzentraten.

3.4 Weiteres Vorgehen:

Am 6. und 7. posthypoxischen Tag, nachdem der endogene Erythropoietin-Spiegel assymptotisch auf Null abgesunken ist, wurde jedem Tier jeweils 1 ml Urinkonzentrat intraperitoneal injiziert. Am 8. posthypoxischen Tag erhielt jedes Tier 0,2 ml des mit 0,25 /uCi Fe^{59}-markierten Plasmas intravenös in die Schwanzvene gespritzt. Um Blutaustritte zu vermeiden, wurde die Punktionsstelle

mit einem Lötkolben versengt und mit Nobecutan-Spray abgedichtet.

Das Fe^{59}-Präparat wurde als Eisencitrat in isotoner Lösung bei pH 5 "zur Injektion für diagnostische Zwecke" von der Firma Hoechst geliefert. Das 1,0 ml Eisencitrat wurde im Fläschchen mit physiologischer Kochsalzlösung auf 10 ml gelöst, die Aktivität am Verbrauchstag berechnet und die benötigte Menge mit Plasma 10 Minuten lang inkubiert.

Das Plasma mit dem für den Eisen-Transport entscheidenden Transferrin mußte für die jeweilige 30 - 35 pro Versuch benötigten Tiere von weiteren 20 - 30 Mäusen durch Entbluten und Zentrifugieren gewonnen werden.

Am 10. posthypoxischen Tag wurde das Gewicht jeder Maus festgestellt. Die Mäuse wurden unter leichter Äthernarkose an der Vena und Aorta abdominalis entblutet. 0,5 ml Blut pro Tier wurden in Probenröhrchen zu 1,5 ml 0,25 %-iger Ammoniaklösung (ammoniated aqua dest.) gegeben. Dies war für die Lyse der Erythrocyten nötig. Gleichzeitig wurden zur HK-Bestimmung je Tier zwei heparinisierte Mikrohämatokritröhrchen zu 3/4 mit Blut gefüllt.

Bei einem Hämatokrit unter 55 % wurde keine Auswertung vorgenommen. Pro Versuchsreihe wurden 10 Standardwerte (0,2 ml Plasma, Fe^{59}-markiert, 1,8 ml ammoniated aqua dest. 0,25 %) sowie 5 Nullwerte mitgemessen.

Die Impulsmessungen wurden in einem Gamma-Spektrometer der Firma Siemens bei folgender Einstellung durchgeführt:

HV 0,8721 kV

Baseline 400

Windows 180

Abschwächer 40 bei einer Impulsvorwahl von 10 000 Ipm.

Die maximale Zähldauer betrug 33,3 Min./Probe.

Berechnet wurden die Impulse/Minute und die statistische Fehlermöglichkeit mit einer durch ein spezielles Programm 1 des Strahleninstituts Tübingen durchgeführten Diel-Rechenmaschine, die dem Gamma-Szintillation-Counter direkt angeschlossen war.

Der prozentuale Eiseneinbau wurde nach folgenden Berechnungs-Formeln durchgeführt:

a) $$\frac{Xg}{\text{Erythrocytenvolumen gesamt}} = \frac{\text{Fe-Imp. Probe}}{\text{Ery-Vol.Probe}}$$

b) $$\frac{\text{Fe Standard}}{Xg} = \frac{100}{XE}$$

Xg = Gesamt-Fe-Impulse im Blut

XE = prozentualer Fe-Einbau

X. PATIENTENGUT

Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten sind Kinder in einem Alter von 1 bis 12 Jahren. Das Alter liegt im Mittel bei 6, 9 Jahren beiden, jedoch vorwiegend männlichen Geschlechts.

Notgedrungen läßt sich in einer Kinderklinik in dieser Altersklasse nur Urin von erkrankten Kindern sammeln. Es wurde jedoch darauf geachtet, daß die Krankheiten keinen Einfluß auf das Bildungssystem der roten Blutkörperchen haben.

Die gefundenen ESF-Werte stellen somit Normalwerte dar. -

1. M.M. geb. am 16.4.65, männlich
   Diagnose (23.4.70): Oesophagus-Stenose nach Oesophagitis nach Hiatus-Hernie

2. C.D. geb. am 28.9.70, männlich
   Diagnose (8.4.74): Gemeinsamer Ventrikel mit rudimentärem rechtem Ausflußtrakt und C-Transposition der großen Gefäße; Zustand nach Pott'scher Anastomose 1969 (in Mainz)

3. S.P. geb. am 18.8.67, männlich
   Diagnose (7.5.73): Neurofibromatose Recklinghausen. Hydrocephalus internus durch Aquäduktverschluß. Funktionsloses Pudenz-Heyer-Ventil.

4. T.C. geb. am 10.3.68, weiblich
   Diagnose (23.3.74): Seitenbetonter, langer Grand-Mal-Anfall

5. K.B. geb. am 10.6.71, männlich
   Diagnose (12.11.71): Unvollständige Lippenspalte links; Lippenplastik.

6. P.G. geb. am 27.5.64, männlich
Diagnose (9.6.76): Hämophilie A

7. B.H. geb. am 28.6.67, männlich
Diagnose (19.5.76): Hämophilie A

8. B.B. geb. am 30.6.66, weiblich
Diagnose (17.5.76): Malignes Hämangioendotheliom

9. R.S. geb. am 30.9.62, männlich
Diagnose (13.3.74): Abszedierende Pleuropneumonie,
Erythema exsudativum multiforme

10. L.B. geb. am 27.3.73, männlich
Diagnose (15.5.74): Tracheitis

11. D.C. geb. am 21.7.64, männlich
Diagnose (23.4.74): Mumps-Meningitis

XI. ERGEBNISSE

1. Standard-Kurve

Es wurde versucht, die Dosis-Wirkung-Beziehung zwischen der verabreichten Menge an Einheiten Labor-Erythropoietin (Abszisse) und der entsprechend erfolgten Fe^{59}-Einbaurate (Ordinate) einmal mit der linearen Regression darzustellen, zum zweiten durch den Ansatz einer nicht linearen Regression 3. Grades mit der unab-

hängigen Variablen X und zum dritten in einer halblogarithmischen Darstellung.+

Die Mittelwerte des Fe^{59}-Einbaus zeigen bis 0,8 Einheiten Erythropoietin einen kontinuierlich linearen Anstieg, um dann bis 1,2 Einheiten Erythropoietin abzufallen und dann wieder bis 1,4 Einheiten Erythropoietin steil anzusteigen.

a) Die lineare Regression ($y = 0,64 + 18,79x$) gibt einen Zusammenhang zwischen den Konzentrationen an Labor-Erythropoietin und der Fe^{59}-Einbaurate wider. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ist ein Korrelations-Koeffizient von $r = 0,792$ hochsignifikant. Ein Anteil von 37,25 % der Varianz ist durch diesen Regressionsansatz nicht erklärbar.

+ Zur Errechnung diente ein Programm des Datenverarbeitungs-Instituts der Universität Tübingen, das Herr Schubring freundlicherweise zur Verfügung stellte.

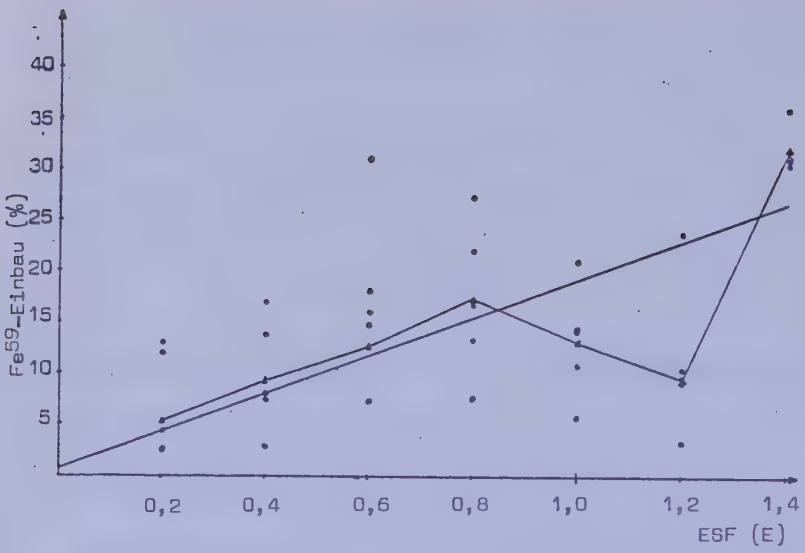

Abb. 9: Regressionsgerade der Dosis-Wirkung-Beziehung zwischen Erythropoietin und der Fe^{59}-Inkorporationsrate

b) Die nicht lineare Regression 3. Grades mit der unabhängigen Variablen X ($y = - 13,58 + 119,44x - 164,85x^2 + 73,16x^3$) weist bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % eine Korrelation von r = 0,833 auf. Dabei ist ein Anteil von 30,59 der Varianz nicht erklärbar.

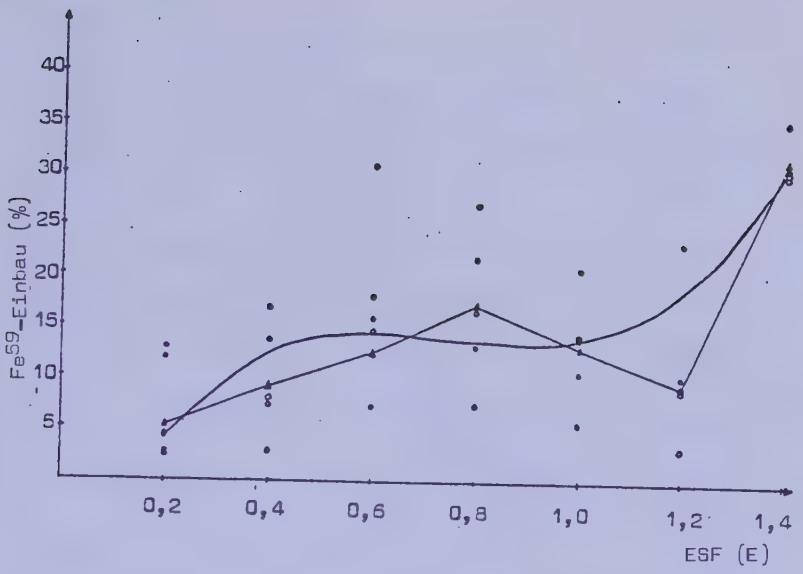

Abb. 10: Nicht lineare Regressionskurve der Dosis-Wirkung-Beziehung zwischen Erythropoietin und der Fe^{59}-Inkorporationsrate

Rechnerisch kommt es bei x = 0,61 Einheiten Erythropoietin mit y = 14,53 % Fe^{59}-Einbau zu einem Maximum. Daraufhin sinkt der Fe^{59}-Einbau bis y = 13,72 % bei einem Erythropoietin-Wert von x = 0,89 Einheiten ab, um ab dort wieder rasch anzusteigen.

c) Bei der halblogarithmischen Kurve werden die x-Werte logarithmiert, die y-Werte linear zur Darstellung gebracht.

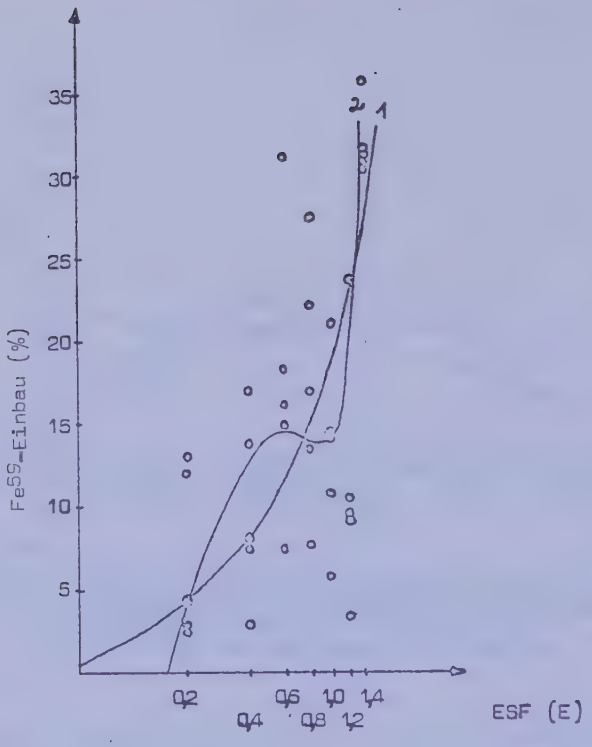

Abb. 11: Halblogarithmische Darstellung der linearen (1) und nicht linearen (2) Regressionskurven

Für die Auswertung wurde aus Gründen, die in der Diskussion besprochen werden, die logarithmische Darstellung der linearer Regression verwendet.

Um die aus unserem Präparat gewonnenen Werte in Internationalen Einheiten ausdrücken zu können, mußten wir sie an in der Kinderklinik erstellten Werten vergleichen, die mit einem Standard

B-Präparat gewonnen wurden (unveröffentlicht von H. BÖMER).

Dabei standen 2 Ampullen der Secand International Reference Preparation of Erythropoietin, Human Urinary for Bioassay No. 2545 der WHO zur Verfügung.

Bei dieser Regressionsgeraden mit dem Ansatz $y = - 0,28 + 35,27x_1$ lag der Korrelationskoeffizient bei 0,87. Für die Steigung ergibt sich $a_1 = 35,27$.

Die Steigung unseres gekauften Laborstandards beträgt $a_1 = 18,79$.

Somit entsprächen $1 \text{ I.E.} = \frac{35,27}{18,79} = 1,88 \text{ E}$

unseres Labor-Standardpräparates.

1 I.E. = 1,88 E

Den Erythropoietin-Spiegel im 24-h-Urin errechneten wir durch Multiplizierung des erhaltenen Wertes mit dem Faktor 12. Dieser Faktor ergibt sich, wenn man berücksichtigt, daß der Urin auf 24 ml eingeengt wurde, von diesem Konzentrat jedoch nur 2 ml für den Tierversuch benötigt wurden.

2. Normalwerte

1. M.M.

24-h-Urin		6.12.-7.12.73
Laborwerte (25.5.71):	HK:	40,0
	HB:	12,0
Fe^{59}-Einbau in %:		9,29
Standardabweichung:		± 5,72
E. Erythropoietin:		5,52
I.E.Erythropoietin:		3,0

2. C.D.

24-h-Urin		21.3.-22.3.74
Laborwerte (8.4.74):	HK:	47,0
	HB:	15,7
Fe^{59}-Einbau in %:		2,72
Standardabweichung:		± 0,90
E. Erythropoietin:		1,32
I.E.Erythropoietin:		0,708

3. S.P.

24-h-Urin		6.3.-7.3.74
Laborwerte	HK:	-
	HB:	-
Fe^{59}-Einbau in %:		15,01
Standardabweichung:		± 3,40
E. Erythropoietin:		9,12
I.E.Erythropoietin:		4,8

4. T.C.

24-h-Urin		6.3.-7.3.74
Laborwerte (4.3.74):	HK:	-
	HB:	13,8
Fe^{59}-Einbau in %:		3,09
Standardabweichung:		± 2,47
E. Erythropoietin:		1,56
I.E.Erythropoietin:		0,828

5. K.B.

24-h-Urin		7.3.-8.3.74
Laborwerte (21.3.72):	HK:	36,0
	HB:	11,1
Fe^{59}-Einbau in %:		6,98
Standardabweichung:		± 3,14
E. Erythropoietin:		4,08
I.E.Erythropoietin:		2,16

6. P.G.

24-h-Urin		10.3.-11.3.74
Laborwerte:	HK:	-
	HB:	-
Fe^{59}-Einbau in %:		1,46
Standardabweichung:		± 0,89
E. Erythropoietin:		0,528
I.E.Erythropoietin:		0,276

7. B.H.

24-h-Urin		25.11.-26.11.74
Laborwerte:	HK:	-
	HB:	-
Fe^{59}-Einbau in %:		21,67
Standardabweichung:		± 15,74
E. Erythropoietin:		13,44
I.E.Erythropoietin:		7,20

8. B.B.

24-h-Urin		27.11.-28.11.74
Laborwerte (27.8.74):	HK:	35,0
	HB:	11,2
Fe^{59}-Einbau in %:		0,71
Standardabweichung		± 0,53
E. Erythropoietin		0,044
I.E.Erythropoietin		0,013

9. R.S.

24-h-Urin		7.5.-8.5.74
Laborwerte (13.3.74):	HK:	-
	HB:	12,3
Fe^{59}-Einbau in %:		1,12
Standardabweichung:		± 1,06
E. Erythropoietin:		0,306
I.E.Erythropoietin:		0,163

10. L.B.

24-h-Urin		16.4.-17.4.74
Laborwerte:	HK:	-
	HB:	-
Fe^{59}-Einbau in %:		2,06
Standardabweichung:		± 2,06
E. Erythropoietin:		0,906
I.E.Erythropoietin:		0,482

11. D.C.

24-h-Urin		28.3.-29.3.74
Laborwerte:	HK:	-
	HB:	-
Fe^{59}-Einbau in %:		3,11
Standardabweichung:		± 3,0
E. Erythropoietin:		1,577
I.E.Erythropoietin:		0,839

XII. DISKUSSION

Die Ergebnisse zeigen im Bereich von 0,8 Einheiten bis 1,2 Einheiten Erythropoietin trotz Dosiserhöhung eine Sättigung bzw. einen Rückgang der Fe^{59}-Einbaurate. Dies scheint uns nicht artefiziell bedingt zu sein.

Um diesem Verlauf gerecht zu werden, wäre ein kubischer Rechenansatz im Sinne einer nicht linearen Regression 3. Grades mit einer unabhängigen Variablen x wünschenswert. Da jedoch der

Kurvenabfall nur hypothetisch erklärbar ist und die lineare Regression in der Literatur allgemein zur Darstellung kommt, entschieden wir uns für die Kurve der linearen Regression.

Zur besseren Darstellung, insbesondere für höhere Fe^{59}-Einbauwerte wurde der logarithmischen Einteilung der Abszisse der Vorzug gegeben.

Der sigmoide Kurvenverlauf konnte von mehreren Autoren bei verschiedenen Mehtoden festgestellt werden (20, 77).

Die Erythropoietin-Präparate enthalten in jedem Falle noch weitere aktive Moleküle und Molekular-Komplexe, die die spezifische Aktivität von Erythropoietin beeinflussen. Diese Aktivitäten lassen sich chromatographisch darstellen (132). Die Beeinflussung könnte in Form einer Polymerisation oder in einer chemischen Modifizierung liegen, entweder während der Isolierung oder durch physiologische Abläufe bei den Versuchstieren. Versuche von GOLDWASSER und KUNG zeigen nämlich, daß sialidase-behandeltes Erythropoietin beim in-vivo-System keine Aktivität besitzt, beim Krochenmark-Kultur-System jedoch aktiv war (49).

ERSLEV (24) konnte aus der Niere einen spezifischen Erythropoietin-Inhibitor isolieren, der Lipid-Natur besitzt. Er ist so stark wirksam, daß aus Nierenkonzentraten die Erythropoietin-Gewinnung nur im geringen möglich ist. Seiner Ansicht nach ist es möglich, daß dieser Inhibitor die wahren Aktivitätsverhältnisse der Nierenkonzentrate maskiert.

Die inhibitorischen Eigenschaften bei höheren Erythropoietin-

Gaben verschwinden bei niedrigeren Konzentrationen. Es wird die Ansicht vertreten, daß ab einem bestimmten Schwellenwert die Verunreinigungen der Präparate die Erythropoietin-Aktivität herabsetzen. Dieses könnten Hämolysine sein, die zu toxischen Reaktionen führen. Diese Toxine finden sich vor allem in aus Urin gewonnenen Präparaten (15). Auch wir konnten bei unseren Testpräparaten der Kinder bei den Versuchstieren Reaktionen beobachten, die Toxine als Ursache vermuten lassen. Dabei verendeten einige wenige Tiere nach Erythropoietin-Injektion mit heftigen Spasmen. COTES berichtet weiter, daß 1 ml oder 2 ml Plasma, den Test-Tieren injiziert, zur Hämolyse oder Agglutination der Erythrocyten führen können. Dies beeinflußt die Ergebnisse insoweit, als die Test-Tiere auf den dadurch abfallenden Sauerstoff-Partialdruck mit einer endogenen Erythropoietin-Ausschüttung antworten.

Urin-Konzentrate haben andererseits jedoch den Vorteil, daß sie keine beeinflussenden Plasma-Proteine besitzen.

Für den sigmoiden Kurvenverlauf können nach unserem Dafürhalten sowohl das Erythropoietin selbst, sowie Molekülkomplexe von Proteinnatur mit Eigenaktivität, Toxine in Form von Hämolysinen und anderen harnpflichtigen Substanzen sowie Inhibitoren, die spezifisch auf die Erythropoietin-Aktivität wirken, verantwortlich sein. Hypothetisch könnte es noch möglich sein, daß irgend ein physiologischer Mechanismus im Sinne eines Feed-Back-Systems bei Erreichen einer bestimmten Erythropoietin-Konzentration zu einer Gegenreaktion im Fe^{59}-Einbau führt. Wenn dann jedoch die Konzentration weiter erhöht wird, führt dies zur Auslösung eines zweiten Systems, das einen gesteigerten Fe^{59}-Einbau bewirkt.

Die aus dem 24-h-Urin von Normalkindern gemessenen Erythropoietin-Konzentrationen zeigen eine ziemliche Streuung, die beim Ältesten (12-jährig) R.S. 0,163 I.E. beträgt, beim Jüngsten (1-jährig) 0,482 I.E.. Es wurde auch ein Wert von 0,023 I.E. errechnet.

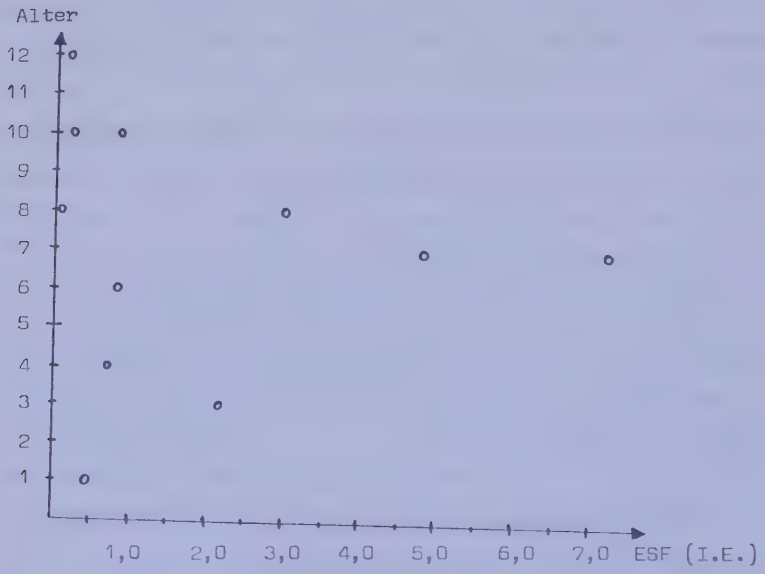

Abb. 12: Erythropoietin-Konzentrationen von "Normalkindern" unserer Klinik in Abhängigkeit vom Alter

Im Mittel lassen sich 1,862 I.E. bei einer Standard-Abweichung von $\bar{x} = \pm 2{,}294$ Erythropoietin mit dem Bioassay finden. ALEXANIAN gibt als Normalwerte bei 24-h-Urinen einen Erythropoietin-Gehalt von ungefähr 5 I.E. für Erwachsene an (2). Damit liegen unsere Werte bedeutend niedriger.

Die Urin-Konzentrate wurden jeweils bis zur Aufbereitung bis zu

einem Jahr bei - 18° C aufbewahrt. LOWY und KEIGHLEY (95) stellten in Versuchen fest, daß Erythropoietin bei - 20° C jahrelang lagerbar ist. Zwar kann es bei raschem Einfrieren zu Aggregatsbildungen sowie pH-Änderungen kommen, die Denaturierungen sind jedoch gering (12, 18). Auch FINNE (33) und ADAMSON (1) haben mit dieser Gefrier-Methode keinen Verlust zu verzeichnen.

Wir verwendeten zur Urin-Konzentrierung die Diaflo-Ultrafiltrationsmembran PM 10. Diese Polyionenmembran besitzt den Vorteil, daß Moleküle unter 10 000 Molekulargewicht aktiv durch die Membran geschleust werden. Bei den Mikroporenfiltern dagegen führen Makromoleküle zur raschen Verstopfung der Poren (101). MIYASATO und POLLAK konnten an Visking-Cellulose-Schläuchen Eiweißverluste feststellen, die durch Adhäsion verursacht sind (105). Die Gesamteiweißfindung bei den Mikroporen-Filtern beträgt 48,6 % (101). Eine Einengdauer von 18-21 Tagen für 2 l Urin lassen deren Verwendung ungünstig erscheinen (105).

ADAMSON et al. (1) können mit ihrer membrandialyse mit Carbowax 20M keinen Aktivitätsverlust feststellen. Ein Nachteil der Dialyseschläuche ist die Möglichkeit einer Gegendiffusion. Dies führt zum Eindringen von Konzentriermittel (66), die durch Bindung von Eiweißpräzipitaten zu Aktivitätsverlusten bis zu 30 % führen (135).

RENNER (116) verwendete zur Konzentrierung die Polyionenmembran UM 10. Die Filtriergeschwindigkeit nahm nur bei zunehmender Calciumkonzentration des Urins ab, blieb jedoch bei zunehmender Eiweiß-, Harnstoff- und Kochsalzkonzentration sowie bei pH-

Veränderungen im physiologischen Bereich konstant. Der Verlust an Einzelproteinen betrug meist weniger als 10 % (116).

Auch wir konnten bei einer 5-8-stündigen Dauer für die Einengung von 500 ml Urin je nach Farbe des Urins verschiedene Durchlauf-Geschwindigkeiten beobachten. Es fiel auf, daß in der initialen Phase beträchtige Mengen des Urins konzentriert wurden, während sich der Durchlauf schon nach 1-2 Stunden sehr langsam vollzog. Sedimente gröberer Art als Ursache dieses Phänomens scheiden aus, da diese mit Selecta-Filtern beseitigt wurden.

Die Erythropoietin-Sekretion ist nach ADAMSON et al. (1) tagesabhängig, wobei die Werte von Tag zu Tag große Unterschiede aufweisen. Die Ursachen dafür sind noch nicht geklärt.

Die Empfindlichkeit der Wiedergabe von Erythropoietin-Werte ist auch von der Wahl der verschiedenen in-vivo- oder in-vitro-Systeme abhängig. Dabei erzielen die einzelnen Autoren mit ihren entsprechenden Methoden eine immer genauere Erfassung der Erythropoietin-Konzentrationen.

ASSAY-Methoden	erfaßbare Minimal-Dosis (IU Ep)	Präzisions-Index
1) Hypertransfund.polycyth. Mäuse (ROSSE et al. 1962)	0,03	0,364
2) Exhypox.polycyth. Mäuse (COTES 1968)	0,05	0,31 -0,52
3) Hungerratten (GORDON und WEINTR. 1962)	0,50	0,128-0,467
4) Knochenmark Ratten in vitro (R.H.PAINTER,unpubl.observ.)	0,02	0,053-0,14
5) Fetale Leberzell-Kult. in vitro (STEPAENSON + AXELRAD, 1971)	0,01	0,036-0,60

IMMUNOL. ASSAYS	erfaßbare Minimal-Dosis (immunochem.Einheiten)
1) Hämagglut.Inhib.Test (LANGE et al., 1972)	$0,87 \times 10^{-4}$
2) Radioimmunoassay	$0,010 \times 10^{-3}$

Tabelle 1: Zusammenfassender Vergleich der Assay-Methoden nach GORDON (56)

Bei den in-vivo-Versuchen sind heute die hungernde Ratte (63) sowie die polycythämische Maus am gebräuchlichsten. Nachteilig bei der Hungerratte ist, daß Proteine des injizierten Testmaterials zu einer Steigerung der Erythropoiese führen. Nach FRIED (38) können bei der hungernden Ratte nur Werte bis 1,0 I.E. Erythropoietin erfaßt werden. Bei plethorischen, exhypoxisch polycythämischen Mäusen ergeben sich Werte bis 0,02 I.E. Erythropoietin.

In der Tabelle 1 ist zu ersehen, daß mit der fetalen Leberzell-Kultur in vitro eine Minimaldosis von 0,01 I.E. Erythropoietin zu erfassen ist. Diese Methode ist deshalb sehr ökonomisch, da von jeder schwangeren Maus 300-400 fetale Leberzell-Kulturen gewonnen werden können. Nachteilig für alle in-vitro-Systeme ist, daß toxische und andere beeinträchtigenden Faktoren das Ergebnis grob verfälschen können, da kein Tierorganismus zur Minderung oder Beseitigung der Phänomene beitragen kann.

Die immunochemischen Assays setzen eine große Reinheit der Erythropoietin-Präparate voraus. Nur so ist eine Minimaldosis von 0,045 mU erfaßbar. GARCIA erhielt zwischen 4,5 und 11,0 mU Erythropoietin/ml Plasma (41).

Gelingt es, Erythropoietin ohne Inhibitoren und Toxinen zu isolieren, so wäre dem Radioimmunassay auch im Hinblick auf die klinische Bedeutung eine vorrangige Verwendung zu geben.

XIII. ZUSAMMENFASSUNG

Die Erstellung einer Standard-Kurve brachte mit unserem Laborstandard bei höheren Erythropoietin-Konzentrationen einen deutlichen Abfall der Fe^{59}-Inkorporation im Bereich von 0,8-1,2 E Erythropoietin. Von dort an nimmt der Fe^{59}-Einbau wieder zu. Die Urinkonzentrierung erfolgte durch eine Ultrafiltrierung mit einer Diaflo-Membran PM 10. Die Normalwerte von Erythropoietin bei 11 vorwiegend männlichen Kindern unserer Klinik zwischen 1 und 12 Jahren liegen im Durchschnitt bei 1,862 I.E. Erythropoietin.

ESF-Konzentrationen Labor-E	Tier-Nr.	HK %	Impulse/Min.	Fe^{59}-Einbau in %	Mittelwerte $\bar{x}$ in %	Stand.Abweichung in %
0,2	1	–	1 246,571	13,021		
	2	60	326,979	2,718		
	3	63	1 343,333	11,999	5,48	± 4,43
	4	54	315,068	2,692		
	5	61	420,630	4,515		
0,4	6	59	1 825,872	17,015		
	7	74	323,774	2,688		
	8	60	830,806	8,026	9,24	± 7,24
	9	46	1 406,008	13,878		
	10	53	832,223	7,537		
0,6	11	62	1 868,285	18,000		
	12	–	1 552,513	16,088		
	13	54	3 351,580	31,041	12,72	± 7,47
	14	62	773,644	7,444		
	15	54	1 598,934			
0,8	16	58	2 522,598	22,083		
	17	60	1 673,826	16,862		
	18	66	898,486	7,625	17,45	± 7,64
	19	65	1 441,614	13,350		
	20	65	3 008,876	27,355		

ESF-Konzentrationen Labor-E	Tier-Nr.	HK %	Impulse/Min.	Fe^{59}-Einbau in %	Mittelwerte $\bar{x}$ in %	StandAbweichung in %
1,0	21	57	1 480,165	14,403		
	22	57	2 118,344	21,125		
	23	61	1 652,073	14,333	13,30	± 5,60
	24	56	1 193,198	10,797		
	25	68	723,397	5,849		
1,2	26	47	2 319,916	23,900		
	27	52	1 054,314	9,495		
	28	68	1 082,856	9,597	9,597	-
	29	54	386,336	3,449		
	30	52	1 344,929	13,049		
1,4	31	65	3 944,254	35,979		
	32	69	3 420,167	31,147		
	33	60	3 127,769	31,395	32,21	± 2,16
	34	70	3 181,336	31,940		
	35	68	3 146,138	30,593		

Tabelle 2: Versuchs-Werte und Ergebnisse zur Erstellung der Standard-Kurve

Patient	Tier-Nr.	HK %	Impulse/Min.	Fe^{59}-Einbau in %	Mittelwerte $\bar{x}$ in %	Stand.Abweichung in %
M.M. männl.	1	62	260,010	3,16		
	2	54	741,850	9,85		
	3	53	493,089	6,24		
	4	57	203,730	2,26		
	5	61	591,828	8,00	9,29	± 5,72
	6	57	1 159,743	15,75		
	7	62	901,136	12,50		
	8	55	454,357	6,77		
	9	60	950,561	14,08		
	10	55	416,397	5,09		
C.D. männl.	1	54	61,350	3,64		
	2	63	55,920	2,59		
	3	56	48,810	1,49	2,72	± 0,90
	4	67	63,420	3,86		
	5	52	56,010	2,36		
	6	55	54,990	2,45		
S.P. männl.	1	72	103,560	11,09		
	2	70	137,280	17,21	15,01	± 3,40
	3	64	139,800	16,72		
T.C. weibl.	1	73	48,630	1,11		
	2	73	54,780	2.07		
	3	70	64,200	3,80	3,09	± 2,47
	4	74	50,400	1,38		
	5	67	86,250	7,09		

Patient	Tier-Nr.	HK %	Impulse/Min.	Fe^{59}-Einbau in %	Mittelwerte $\bar{x}$ in %	Stand.Abweichung in %
K.B. männl.	1	68	77,700	6,05		
	2	64	102,360	10,48		
	3	64	101,910	10,02	6,98	± 3,14
	4	66	63,300	3,37		
	5	64	69,840	4,96		
P.G. männl.	1	65	109,399	1,97		
	2	54	146,786	-		
	3	67	52,162	0,65		
	4	57	115,915	2,00		
	5	69	34,774	0,31	1,46	± 0,89
	6	58	113,513	2,06		
	7	70	149,489	2,57		
	8	66	52,942	0,69		
	9	63	-	-		
B.H. männl.	1	70	128,408	2,47		
	2	70	572,573	13,55		
	3	60	164,744	3,53		
	4	65	312,002	5,81		
	5	65	1 298,532	32,36	21,67	± 15,74
	6	65	1 825,150	41,54		
	7	70	1 732,201	39,40		
	8	59	1 117,942	22,73		
	9	65	1 531,862	33,63		

Patient	Tier-Nr.	HK %	Impulse/Min.	Fe^{59}-Einbau in %	Mittelwerte $\bar{x}$ in %	Stand.Abweichung in %
B.B. weibl.	1	62	54,6546	0,69		
	2	72	41,9819	0,44		
	3	61	47,0570	0,54		
	4	61	38,0480	0,37	0,71	± 0,53
	5	63	37,8678	0,36		
	6	68	58,2582	0,84		
	7	74	41,8918	0,44		
	8	62	122,8528	1,96		
R.S. männl.	1	74	63,4200	2,57		
	2	76	47,6100	0,69		
	3	76	57,8100	1,88	1,12	± 1,06
	4	75	43,4700	0,13		
	5	80	44,8800	0,33		
L.B. männl.	1	57	45,2700	0,99		
	2	59	144,6301	15,16		
	3	55	78,9900	5,74	2,06	± 2,06
	4	60	47,6400	1,28		
	5	64	45,5100	1,00		
	6	56	47,4300	1,29		
D.C. männl.	1	63	57,2700	2,68		
	2	63	87,6600	7,47	3,11	± 3,0
	3	75	50,3700	1,35		
	4	72	47,9700	0,92		

Tabelle 3: Versuchs-Werte und Ergebnisse zur Erstellung von Normalwerten ESF von Patienten der Kinderklinik Tübingen

XV. LITERATURVERZEICHNIS

1) ADAMSON, JW., ALEXANIAN, R., MARTINEZ, C., FINCH, CA.: Erythropoietin excretion in normal man. Blood, 28, 354-364, 1966

2) ALEXANIAN, R.: Urinary excretion of erythropoietin in normal man and woman. Blood, 28, 344-353, 1966

3) ANNABLE, L.: The sexond international reference preparation of erythropoietin, human,urinary, for bioassay. Bull. WHO, 47, 99-112, 1972

4) BANGHAM, DR.: Biological assay and a standard for "erythropoietin". In: Erythropoiesis, von JACOBSON, LO., DOYLE, M., Grune / Stratton, New York, London, St.23-28, 1962

5) BOIVIN, P., EOCHE-DUVAL, D.; Une technique simple de dosage de l'érythropoiétine chez la souris rendue polycythémique par hypoxie.Rev.Franc.Etud.Clin.Biol., 10, 434-435, 1965

6) BONSDORFF, E.: On the human mechanism in anoxic polycythemia. Acta physiol. scand., 16, Suppl. 53, 8, 1948

7) BORSOOK, H., GRAYBIEL, A., KEIGHLEY, G., WINDSOR, E.: Polycythemic response in normal adult rats to a non-protein plasma extract from anemic rabbits. Blood, 9, 734-742, 1954

8) BURLINGTON, H., CRONKITE, E., REINKE, U., ZANJANI, ED.: Erythropoietin production in cultures of goat renal glomeruli.Proc.Nat.Acad.Sci., 69, 3547-3550, 1972

9) BUSUTTILL, RW., ROH, LB., FISHER, JW.: Localization of erythropoietin in the glomerulus of the hypoxic dog kidney usin a fluorescent antibody technique. Acta haemat. (Basel), 47, 238-242, 1972

10) CARNOT, MP: Sur le mécanisme de lhyperglobulie provoqueé par le sérum dánimaux en rénovation sanguine. C.R. Soc. Biol. (Paris), 61, 344-346, 1906

11) CHIBA, S., KUNG, CKH., GOLDWASSER, E.: Stabilisation of urinary erythropoietin.Biochem.Biophys.Res.Comm., 47, 1372-1377, 1972

12) CHILSON, OP., COSTELLO, LA., KAPLAN, NO.: Effects of freezing on enzymes.Fed.Proc.Suppl., 24, 55-65, 1965

13) COHNEN, G., PAAR, D.: Quantitative Proteinveränderungen nach Einfrieren und Auftauen. Z.klin. Chem.klin. Biochem., 7, 63-65, 1969

14) COLE, RJ., PAUL, J.: The effects of erythropoietin on haem synthesis in mouse yolk sac and cultured foetal liver cells. J.Embryol.Exp.Morph., 15, 245-260, 1966

15) COTES, PM.: Measurement. In: Methods in investigate and diagnostic endocrinology, von BERGSON, SA., YALOW, RS., North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1110-1117, 1973

16) COTES, PM., BANGHAM, DR.: Bioassay of erythropoietin in mice mace polycythemic by exposure to air at reduced pressure. Nature, 191, 1065-1067, 1961

17) COTES, PM., BANGHAM, DR.: The international reference preparation of erythropoietin.Bull.WHO, 35, 751-760, 1966

18) DAVIES, DF.: Quantitative recovery of selected components of serum after rapid freezing and rapid thawing. Fed. Proc., 24, Suppl.15, 249-252, 1965

19) DUKES, PP.: Fractionation of human urinary erythropoietin preparations: components stimulating different processes in erythroid differentiation.Fed.Proc., 29, 873-877, 1970

20) DUKES, PP., HAMMOND, D., SHORE, NA., ORTEGA, JA.: Erythropoietin: acomplex with different in vivo and in vitro activities.J.Lab.Clin.Med., 76, 439-444, 1970

21) DUKES, PP., TAKAKU, F., GOLDWASSER, E.: In vitro studies on the effect of erythropoietin on glucosamine-1-14C incorporation into rat bone marrow cells. Endocrinology, 74, 960-967, 1964

22) ERSLEV, AJ.: Humoral regulation of red blood cell production, Blood, 8, 349-357, 1953

23) ERSLEV, AJ.: Control of the proliferative steady state. In: The kinetics of cellular proliferation, von STOHLMAN, F., Jr., Grune + Stratton, New York, 312-317, 1959

24) ERSLEV, AJ.: Management of the anemia of chronical renal failure.Clinical Nephrology, Vol. 2, 5, 174-178, 1974

25) ERSLEV, AJ.: The effect of erythropoietic agents on the synthesis of erythropoietin in vitro. In: NAKAO, K., FISHER, JW., TAKAKU, F., University Park Press, Baltimore, London, Tokyo, 295-304, 1975

26) ESPADA, J., GUTINSKY, A.: A new method for concentration of erythropoietin from human urine.Biochem.Med., 3, 475-484, 1970

27) ESPADA, J., GUTINSKY, A.; Purification de erythropoietina urinaria humana.Actaphysiol.Let.Amer., 20, 122-129, 1970

28) ESPADA, J., LANGTON, A., DONARDO, M.: Human erythropoietin: Studies of purity and partial characterisation. Bioch. Biophys.Acta, 285, 427-435, 1972

29) ESSERS, U., MÜLLER, W., BRUNNER, E.: Zur Wirkung von Erythropoietin bei Gesunden und bei Patienten mit chronischer Anämie.Klin.Wschr., 51, 1005-1009, 1973

30) ESSERS, U., MÜLLER, W., BRUNNER, E.: Weitere Untersuchungen zur Wirksamkeit von Erythropoietin bei Patienten mit Niereninsuffizienz.Dtschmed.Wschr., 99, 1618-1620, 1974

31) FELDMAN, S., RACHMILEWITZ, EA., IZAK, G.: The effect of central nervous system stimulation on erythropoiesis in rats with chronically implanted electrodes.J.Lab. Clin.Med., 67, 713-725, 1966

32) FILMANOWICZ, E., GURNEY, CW.: Studies on erythropoiesis. XVI. Response to a single dose of erythropoietin in polycythemic mouse.J.Lab.Clin.Med., 57, 65-72, 1961

33) FINNE, PH.: Erythropoietin in concentrates of urine from healthy persons.Brit.Med.J., 5436, 697-699, 1965

34) FISHER, JW., THOMPSON, JF., ESPADA, J.: A radioimmuassay for human urinary erythropoietin.Isr.J.Med.Sci., 7, 873-876, 1971

35) FOGH, J.; A sensitive erythropoietin assay on mice exposed to CO-hypoxia.Scand.J.Clin.Lab.Invest., 18, 33-44, 1966

36) FRIED, W.: The liver as a source of extrarenal erythropoietin production.Blood, 40, 671-677, 1972

37) FRIED, W., PLZAK, CF., JACOBSON, LO., GOLDWASSER, E.: Erythropoiesis.II. Assay of erythropoietin in hypophysectomized rats.Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 92, 203-207, 1956

38) FRIED, W., PLZAK, LF., JACOBSON, LO., GOLDWASSER, E.: Studies on erythropoiesis.III. Factors controlling erythropoietin production.Proc.Soc.Exp.Biol.(NY), 94, 237-241, 1957

39) GALLAGHER, NI., HAGAN, DQ., MCCARTY, JM., LANGE, RD.: Response of starved rats and polycythemic rats to graded doses of erythropoietin.Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 106, 127-131, 1961

40) GALLIEN-LARTIGUE, O., GOLDWASSER, E.: Hemoglobin synthesis in marrow cell culture: the effect of rat plasma on rat cells.Science, 145, 277-279, 1964

41) GARCIA, JF.: The radioimmunassay of human urinary erythropoietin.Intern.Conference Hematopoiesis.I.Regulation of erythropoiesis, von GORDON, AS., CONDORELLI, M., PESCHLE, C. II.Ponte, Rome, 132-155, 1972

42) GARCIA, JF., SCHOOLEY, JC.: Immunological neutralization of various erythropoietins.Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 112, 712-714, 1963

43) GARCIA, JE., VAN DYKE, DC.: Dose-response relationschips of human urinary erythropoietin. J.appl.Physiol., 14, 233-236, 1959

44) GIDARI, AS., ZANJANI, ED., GORDON, AS., et al.: Stimulation of erythropoiesis by pyridine nucleotides.Proc. Soc.Exp.Biol.Med., 141, 59-61, 1972

45) GOLD, ER., FUDENBERG, HH.: Chromic chloride: a coupling reagent for passive hemagglutination reactions.J.Immun., 99, 859-866, 1967

46) GOLDWASSER, E.: The purification and properties of erythropoietin: A critical review. In: Erythropoiesis, von NAKAO, K., FISHER, JW., TAKAKU, F., University Park Press, Baltimore, London, Tokyo, 75-82, 1975

47) GOLDWASSER, E.; Erythropoietin.Blut, 33(3), 135-140, 1976

48) GOLDWASSER, E., GROSS, M.: Erythropoietin: Assay and study of its mode of action.Meth.enzym., NY, 37 PtB, 109-121, 1975

49) GOLDWASSER, E., KUNG, CKH.: Process in the purification of erythropoietin.Ann.N.Y.Acad.Sci., 149, 49-53, 1968

50) GOLDWASSER, E., KUNG, CKH.: Purification of erythropoietin. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 68, 697-698, 1971

51) GOLDWASSER, E., KUNG, CKH.: The molecular weight of sheep plasma erythropoietin.J.Biol.Chem., 247, 5159-5160, 1972

52) GOLDWASSER, E., KUNG, CKH., ELIASON, JF.: On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation.XIII. The role of sialic acid in erythropoietin action.J.Biol. Chem., 249, 4202-4206, 1950

53) GOLDWASSER, E., WHITE, WF.: Purification of sheep erythropoietin.Fed.Proc., 18, 236, 1959

54) GORDON, AS.: Diskussionsbemerkungen. In: Erythropoiesis, von JACOBSON, LO., DOYLE, M., Grune + Stratton, New York, London, St. 29, 1962

55) GORDON, AS.: Humoral influences on blood cell formation and release. In: Hemopoiesis. CIBA foundation symposium. London, St. 325-362, 1960

56) GORDON, AS.: Erythropoietin.Vitam.Horm., 31, 105-174, 1973

57) GORDON, AS., LOEBE, J., DORNFEST, BS., COOPER, GW.: Reticulocyte and leucocyte release from isolated perfused rar legs and femurs. In: Erythropoiesis, von JACOBSON, LO., DOYLE, M., Grune + Stratton, New York, London, St. 321, 1962

58) GORDON, AS., PILIERO, SJ., KLEINBERG, W., FREEDMAN, HH.: Plasma extract with erythropoietic activity.Proc.Soc. Exp.Biol.Med., 86, 255-258, 1954

59) GORDON, AS., WEINTRAUB, AH.: Assay of the erythropoietic stimulating factor (ESF). In: Erythropoiesis, von JACOBSON, LO., DOYLE, M., New York, London, St. 1-16, 1962

60) GORDON, AS., ZANJANI, ED.: Some aspects of erythropoietin physiology. In: Regulation of hematopoiesis, von GORDON, AS., Appleton-Century-Crofts, New York, Vol.1, 413-457, 1970

61) GROSS, M., GOLDWASSER, E.: On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation.V.Characterization of the ribonucleic acid formed as a result of erythropoietin action.Biochem., 8, 1795-1805, 1969

62) GURNEY, CW., DEGOWIN, R., HOFSTRA, D., BYRON, J.: Applications of erythropoietin to biological investigation. In: Erythropoiesis, von JACOBSON, LO., DOYLE, M., Grune + Stratton, New York, London, St. 151-161, 1962

63) GURNEY, CW., GOLDWASSER, E., PAN, C.: Studieson erythropoiesis:VI.Erythropoietin in human plasma.J.Lab.Clin. Med., 50, 534-542, 1957

64) HODGSON, G., TOHA, J., GONZALEZ, E.: The erythropoietic effect of urine and plasma of repeatedly bled rabbits. Blood, 9, 299-309, 1954

65) HOFF, F., BEER, AG.: Dynamik der Leukozytenregulation, Med. Welt (Berlin), 1, 117-123, 1938

66) HOWE, AR., GROOM, T., CARTER, RG.: Use of polyethyleneglycol in the concentration of protein solution. Analyt.Biochem., 9, 443-453, 1964

67) HUFF, RL., HENNESSY, TG., AUSTIN, RC., GARCIA, JF., ROBERTS, BM., LAWRENCE, JH.: Plasma and red cell iron turnover in normal subjects and in patients having various hematopoietic disorders.J.Clin.Invest., 29, 1041-1052, 1950

68) IKEGAMI, S., TAMURA, S., HIROSHI OLDE: Simple purification procedure for human urinary erythropoietin. Proc. Soc.Exp.Biol., 143, 526-527, 1973

69) ITO, K., REISSMANN, KR.: Quantitative and qualitative aspects of steady state erythropoiesis induced in protein-starved rats by longterm erythropoietin injection.Blood, 27, 343-351, 1966

70) JACOBSON, LO., MARKS, EK., GASTON, EO.: Studies on erythropoiesis.XII. The effect of transfusion-induced polycythemia in the mother on the fetus.Blood, 14, 644-653, 1959

71) JACOBSON, LO., GOLDWASSER, E., FRIED, W., PLZAK, LF.: Role of the kidney in erythropoiesis.Nature (London), 179, 633-634, 1957

72) JORDAN, TA., MCDONALD, TP., LANGE, RD.: The haemagglutinating properties of an antiserum to erythropoietin. Amer.J.Med.Techn., 35, 595-604, 1969

73) KABAT, EA., MAYER, MM.: Experimental immuno-chemistry. CC. Thomas, Springfield, 2. Aufl., St. 871, 1961

74) KAPLAN, SM., ROTHMANN, SA., GORDON, AS., et al.: Extrarenal sites of erythrogenin production.Proc.Soc.Exp. Biol.Med., 143, 310-313, 1973

75) KAWAKITA, M., MIYAKE, T., KISHIMOTO, S.: Purification of urinary erythropoietin. In: Erythropoiesis, von NAKAO, K., FISHER, JW., TAKAKU, F., University Park Press, Baltimore, London,Tokyo, 55-65, 1975

76) KEIGHLEY, G.; Experiences with assays, units and standards of erythropoietin. In: Erythropoiesis, von JACOBSON, LO., DOYLE, M., Grune + Stratton, New York, London, St. 17-22, 1962

77) KEIGHLEY, G.: Further experiences with assays, units, and standards of erythropoietin.Ann.N.Y.Acad.Sci., 149, 18-24, 1968

78) KEIGHLEY, G., LOWY, PH., BORSOOK, E., GOLDWASSER, E., GORDON, AS., PRENTICE, TC., RAMBACH, WA., STOHLMAN, F., Jr., VAN DYKE, DC.: A cooperative assay of a sample with erythropoietic stimulating activity.Blood, 16, 1424-1432, 1960

79) KOLK-VEGTER, AJ., KOLK, AHJ., NAPIER, JAF., DUNN, CDR.: Some problems concerning the assay of erythropoietin using the hemagglutination-inhibition kit.Brit.J. haemat., 30(3), 371-372, 1975

80) KOMIYA, E.: Die zentral-nervöse Regulation des Blutbildes. Thieme-Verl., Stuttgart, 1956

81) KOMIYA, E.: Weitere Beiträge über die neurohumorale Regulation des Blutbildes.Folia haemat.(Frankf./M.), 3, 46-57, 1958

82) KRANTZ, SB.: Response of polycythemia vera marrow to erythropoietin in vitro.J.Lab.Clin.Med., 71, 999-1012, 1968

83) KRANTZ, SB., GALLIEN-LARTIGUE, O., GOLDWASSER, E.; The effect of erythropoietin upon heme synthesis by marrow cells in vitro.J.Biol.Chem., 238, 4085-4090,1963

84) KURATOWSKA, Z., LEWARTOWSKI, B., LIPINSKI, B: Chemical an biological properties of an erythropoietingenerating substance obtained from perfusates of isolated anoxic kidneys.J.Lab.Clin.Med., 64, 226-237, 1964

85) LAJTHA, LG.: Diskussionsbemerkungen in: Colloquium über Erythropoietin.VIII.Eur.Congr.Hematology, Wien, 1961

86) LANGE, RD.: Immunological studies on erythropoietin. In: Kidney Hormones, von FISHER, JW., Academic Press, New York, 373-396, 1971

87) LANGE, RD.: Erythropoietin.3.3. Hemagglutinationinhibition-assay. In: Methods in investigate and diagnostic endocrinology, von BERGSON, SA., Yalow, Rs., North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1124-1130, 1973

88) LANGE, RD., MCCARHY, JM., GALLAGHER, NJ.: Plasma and uninary erythropoietin in bone marrow failure.Arch.Int. Med., 108, 850-858, 1961

89) LANGE, RD., MCDONALD, TP., JORDAN, T.: Antisera to erythropoietin: partial characterization of two different antibodies.J.Lab.Clin., 73, 78-90, 1969

90) LANGE, RD., SIMMONS, ML., DIBELIUS, NR.: Polycythemic mice produced by hypoxia in silicone rubber membrane enclosures: a new technique.Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 122, 761-764, 1966

91) LEWIS, JP., ALFORD, DA., NEAL, WA., MOORES, RR., WELCH, ET., GARDNER, E., WRIGHT, CS., SMITH, LL.: Erythropoiesis stimulating factors.Scand.J.Haem., 8, 200-209, 1971

92) LEWIS, JP., ASFORD, DA., RATHJEN, JH., Jr., LANGE, RD.: Preparation of human urine conentrate for erythropoietin studies.J.Lab.Clin.Med., 66, 987-993, 1965

93) LEWIS, JP., GALLAGHER, NI., CARMODY, SE., LANGE, RD.: Erythropoietic activity in human urine concentrate. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 116, 742-745, 1964

94) LINMAN, JW., BETHELL, FH: The plasma erythropoietic stimulation factor.Observations on circulating erythrocytes and bone marrow of rat receiving protein-free extracts of rabbit plasma. Blood, 11, 310-323, 1956

95) LOWY, PH., KEIGHLEY, G.: Use of phenol in the isolation of erythropoietic glycoprotein.Nature(London), 192, 75, 1961

96) LOWY, PH., KEIGHLEY, G.: The fractionation of erythropoietin from anemic and normal human urine.Ann.N.Y. Acad.Sci., 149, 54-62, 1968

97) LUKOWSKY, WA., PAINTER, RH.: Molecular weight of erythropoietin from anemic sheep plasma and human urine.Danad. J.Biochem., 46, 731-734, 1968

98) MARINONE, G., CORSO, F.: New data on the control of erythropoiesis. Proc.VI.Internat. Congr.Hemat., St. 782-783, 1958

99) MARVER, D., GURNEY, CW.: Renal erythropoietin excretion as a function of acid base balance.Ann.N.Y.Acad.Sci. 149, 570-575, 1968

100) MATOTH, GL., KAUFMANN, L.: Mitotic activity of erythroblasts pre-exposed to erythropoietin. Blood, 20, 165-172, 1962

101) MCGARRY, E., SEKON, AH., ROSE, E.: The isolation and electrophoretic characterization of the proteins in the urine for normal subjects.J.Clin.Invest., 34, 832, 1955

102) MICHAELS, AS.: Polyelectrolyte complexes.Ind.Eng.Chem., 57, 32-40, 1965

103) MIRAND, EA.: Extra-renal and renal control of erythropoietin production.Ann.N.Y.Acad.Sci., 149, 94-106, 1968

104) MIRAND, EA., WEINTRAUB, AH., GORDON, AS.: Erythropoietic activity of untreated deproteinized normal human plasma. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 118, 823-826, 1965

105) MIYASATO, F., POLLAK, VE.: Serum protein in urine: An examination of the effects of some methods used to concentrate the urine.J.Lab.Clin.Med., 67, 1036-1043, 1966

106) O'SULLIVAN, MB., CHIBA, Y., GLEICH, GJ., LINMAN, JW.: Some molecular characteristics of human urinary erythropoietin determined by gel filtration and density-gradient ultracentrifugation.J.Lab.Clin.Med., 75, 771-779, 1970

107) PENNELL, RB.: Low-temperature preservation of proteins. Fed.Proc., 24, Suppl. 15, 269-272, 1965

108) PESCHLE, G., MARONE, G., GENOVESE, A., QUATTRIN, S., CONDORELLI, M.: Studies on the erythrogenin(Eg)-Erythropoietin(Ep)-system. In: Erythropoiesis, von NAKAO, K., FISHER, JW., TAKAKU, F., University Park Press, Baltimore, London, Tokyo, 241-253, 1975

109) PLZAK, CF., FRIED, W., JACOBSON, LO., BETHARS, WF.: Demonstration of stimulation of erythropoiesis by plasma from anemic rats using Fe_{59}. J.Lab.Clin.Med., 46, 671-678, 1955

110) POLLAK, WE., GAIZUTIS, M., REZAIAN, J.: Serum proteins in urine: Examination of a new method for concentrating urine.J.Lab.Clin.Med., 71, 338-344, 1968

111) POWSNER, EL., BERMAN, D.: Effect of erythropoietin on DNA-synthesis by erythroblasts.Blood, 30, 189-197, 1967

112) PRENTICE, TC., MIRAND, EA.: Effect of hypoxia on plasma erythropoietin in the rabbit.Proc.Soc.Exp.Biol.(NY), 106, 501-502, 1961

113) REISSMAN, KR.: Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. Blood, 5, 372-380, 1950

114) REISSMAN, KR., UDUPA, KB.: Effect of erythropoietin on proliferation of erythropoietin-responsive cells. Cell.Tissue Kinet., 5, 481-489, 1972

115) REMMELE, W.: Die humorale Steuerung der Erythropoiese, Springer-Verl. Berlin, (a)St. 5, (b) St. 10, 1963

116) RENNER, E.: Die renale Clearence von Serumproteinen. Habilitationsschrift, Köln, 1969

117) ROSSE, WF., BERRY, RJ., WALDMANN, TA.: Some molecular characteristics of erythropoietin from different sources determined by inactivation by ionizing radiation.J.Clin.Invest., 42, 124-129, 1963

118) SANDSON, J., ROSENBERG, L., WHITE, D.: The antigenic determinants of the protein-polysaccharides of cartilage.J.Exp.Med., 123 817-828, 1966

119) SCHEIFFARTH, GÄTZ, H., CERNY, R.: Zur Frage der Gefrierdenaturierung von Serumproteinen. Papier- und immunelektrophoretische Untersuchungen.Z.Klin.Chem.Klin. Bioch., 3, 81-84, 1965

120) SCHLUETER, RJ., NORGELLO, H., WHITE, WF.: Erythropoietin. I. Analysis of radioiron assay in fasted rats, using cobalt as a reference standard.Proc.Soc.Exp.Biol.(NY), 103, 43-46, 1960

121) SCHOOLEY, JC., GARCIA, JF., CANTOR, LN., HAVENS, VW.: Part V.Immunological studies on erythropoietin. A summary of some studies on erythropoiesis usinganti-erythropoietin immun serum. Ann N.Y.Acad.Sci, 149, 266-280, 1968

122) SCHULZ, E.: Die klinische Bedeutung des Erythropoietins. Internist (Berlin), 12, 210-215, 1971

123) SEIP, M., HALVORSEN, S., ANDERSEN, P., KAADA, BR.: Effects of hypothalamic stimulation on erythropoiesis in rabbits.Scand.J.Clin.Lab.Invest., 13, 553-563, 1961

124) STEPHENSON, JR., AXELRAD, AA.: Quantitative assay method for erythropoietin in vitro. Endocrinology, 88, 1519-1520, 1971

125) STOHLMAN, F., Jr.: Observations on the physiology of erythropoietin and its role in the regulation of red cell production. Ann.N.Y.Acad.Sci., 77, 710-724, 1959

126) STOHLMAN, F.: Humoral regulation of erythropoiesis. VI. Mechanism of action of erythropoietin in the irradiated animal.Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 107, 751-754, 1961

127) STOHLMAN, F., Jr., BRECHER, G.: Humoral regulation of erythropoiesis.III. Effect of exposure to simulated altitude. J.Lab.Clin.Med., 49, 890-895, 1957

128) STOHLMAN, F., Jr., BRECHER, G.: Humoral regulation of erythropoiesis.V. Relationship of plasma erythropoietine level to bone marrow acticity.Proc.Soc.Exp.Biol. (NY), 100, 40-43, 1959

129) STOHLMAN, F., Jr., QUESENVERRY, P.: The kinetics of myelopoiesis and their relationships to drug-induced neutropenia. In: Drug and hematologic reactions, von DIMITROV, N., NODINE, JH.; Grune + Stratton, New York, London, 173, 1974

130) STOHLMAN, F., RATH, CE., ROSE, JC.: Evidence for a humoral regulation of erythropoiesis. Studies on a patient with polycythemia secondary to regional hypoxia. Blood, 9, 721-733, 1954

131) SUEOKA, N., CHENG, TY.: Fractionation of nuclic acids with the methylated albumin column.J.Molec.Biol., 4, 161-172, 1962

132) THORLING, EB.: Paraneoplastic erythropoiesis and inappropriate erythropoietin production.A review. Scand. J.Haemat., 17, 1-166, 1972

133) VAN DYKE, DC., NOHR, LM., LAWRENCE, JH.: Erythropoietin in the urine of normal and erythropoietically abnormal human beings.Blood, 28, 535-543, 1966

134) VAN DYKE, DC., POLLYCOVE, M.: The relation of erythropoietin to anemia and polycythemia. In: Erythropoiesis, von JACOBSON, LO., DOYLE, M., Grune + Stratton, New York, London, St. 340-350, 1962

135) VAN OSS, CJ.: Separation and purification of plasma proteins. In: Progress in separation and purification, von PERRY, S., Willey J. and Sons, New York, 177, 1968

136) WARD, HP.: An in vitro assay of erythropoietin. Proc.Soc. Exp.Biol.Med., 125, 370-374, 1967

137) WARD, HP., KURNICK, Je., PISARCZYK, MJ.: Serum level of erythropoietin in anemias associated with chronic infection, malignancy and primary hematopoietic decease. J.Clin.Invest., 50, 332-335, 1971

L e b e n s l a u f

Am 26.01.1949 wurde ich, Hans-Joachim Masur, als Sohn des Industriekaufmanns Hyazinth Masur und dessen Ehefrau Luise Masur, geb. Majerczyk, in Münsingen geboren.

Von 1955-1960 besuchte ich die Volksschule in Trochtelfingen/ Hohenzollern, von 1960-1961 das Progymnasium in Gammertingen und von 1961-1969 das humanistische Gymnasium in Bad-Wurzach. Dort legte ich 1969 die Reifeprüfung ab.

Von September bis Dezember 1969 arbeitete ich als Apotheker-Praktikant in der Alten Heslacher Apotheke in Stuttgart.

Vom Sommersemester 1970 bis zum Sommersemester 1975 studierte ich in Tübingen Zahnmedizin. Dort legte ich am 10.10.1972 die zahnärztliche Vorprüfung und am 12.6.1975 das Staatsexamen ab.

Am 1.8.1975 heiratete ich die Lehrerin Angelika Masur, geb. Hofer.

Vom 6.1.76 - 31.3.1977 absolvierte ich meinen Wehrdienst.

Seit dem 2.5.1977 arbeite ich als Assistenz-Zahnarzt in Nagold in der Praxis Dr. H.A. Lilienfein.

Reproduktion: Walter Betz, Metzgergasse 31, 7400 Tübingen